

Gert Schneider

**Automatische Formbestimmung einzelner
strömungskräftefreier Erythrozyten
durch Auswertung von Intensitätsbildern
defokussierter mikroskopischer Aufnahmen**



Cuvillier Verlag Göttingen



Automatische Formbestimmung einzelner strömungskräftefreier Erythrozyten durch Auswertung von Intensitätsbildern defokussierter mikroskopischer Aufnahmen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor-Ingenieur

der Fakultät für Informatik und Automatisierung der Technischen Universität Ilmenau
vorgelegt von:

Dipl.-Ing. Gert Schneider

geb. am 12.04.1966 in Dresden

Berichterstatter: Prof. Dr.-Ing. habil. Günter Henning
Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Artmann
Dr.-Ing. Michael Zimmermann

Tag der Einreichung: 12.12.1995

Tag der öffentlichen wissenschaftlichen Aussprache: 18.06.1996



Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Schneider, Gert:

Automatische Formbestimmung einzelner strömungskräftefreier Erythrozyten durch Auswertung von Intensitätsbildern defokssierter mikroskopischer Aufnahmen / vorgelegt von Gert Schneider. - 1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 1996

Zugl.: Ilmenau, Univ., Diss., 1996

ISBN 3-89588-650-5

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 1996

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 1996

Gedruckt auf säurefreiem Papier

ISBN 3-89588-650-5



Meinen Eltern





Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Symbole.....	VIII
1. Einleitung.....	1
2. Die Form des Erythrozyten und seine Bedeutung.....	3
2.1. Aufbau und Ruheformspektrum.....	3
2.2. Ruheform und Lipidbilayer.....	5
2.3. Bisherige Untersuchungen zur Erythrozytenform.....	6
3. Verfahren zur Formbestimmung von Erythrozyten.....	7
3.1. Form und Formbeschreibung.....	7
3.2. Kriterien zur Einordnung schon bestehender Verfahren.....	7
3.3. Elektronenmikroskopische Verfahren.....	8
3.4. Durchflußzytometrische Verfahren.....	8
3.5. Lichtmikroskopische Verfahren.....	9
3.5.1. Tangent Counting.....	9
3.5.2. Monolayerphotometrie.....	11
3.5.3. Leitz- Interferenz- Kontrast.....	12
3.5.4. Interphakoverfahren.....	14
3.5.5. Reflektions- Interferenz- Kontrast- Mikroskopie.....	15
3.5.6. Phasenkontrastmikroskopie.....	17
3.6. Bildverarbeitungsmethoden zur Erythrozytendifferenzierung.....	17
3.7. Dreidimensionale Rekonstruktion biologischer Objekte.....	19
3.8. Zusammenfassung und Beurteilung des internationalen Entwicklungsstandes.....	21
3.8.1. Physikalische Methoden.....	21
3.8.2. Auswerteverfahren in der Bildverarbeitung.....	22
4. Ableitung der Aufgabenstellung und Lösungskonzeption.....	24
4.1. Ableitung der Aufgabenstellung aus dem Entwicklungsstand.....	24
4.2. Vorüberlegungen zur Aufgabenstellung (Bildgewinnung) - Auswertung defokussierter Ebenen.....	25
4.2.1. Detaillierte Beschreibung der Formänderung.....	25
4.2.2. Lage der Blutkörperchen in der Bildebene des Mikroskops.....	26
4.2.3. Lichtintensitätsverteilung in defokussierten Ebenen.....	26
5. Modellbildung zur Beschreibung der Lichtintensitätsverteilung defokussierter Ebenen....	31
5.1. Modelle zur Formbeschreibung.....	31
5.1.1. Auswahl eines Modells zur mathematischen Beschreibung der Erythrozytengeometrie.....	31
5.1.2. Generierung von Modellkörpern zur mathematischen Formbeschreibung von Diskozyten und Stomatozyten.....	34



5.2. Das Blutkörperchen als Linse- geometrisch optische Betrachtung	37
5.3. Wellenoptisches Modell zur Lichtausbreitung unter Berücksichtigung defokussierter Ebenen	39
5.3.1. Kohärenz, Teilkohärenz, Inkohärenz	39
5.3.2. Das Mikroskop als lineares Übertragungssystem.....	41
5.3.3. Defokussierung als Kontrastverfahren	45
6. Formklassifizierung von Erythrozyten aus defokussierten Aufnahmen	47
6.1. Gesamtablauf der Formdetektierung	47
6.2. Verfahren zur Fokussierung von Phasenobjekten basierend auf theoretischen Modellen.....	48
6.3. Extraktion der Erythrozyten vom Hintergrund.....	49
6.4. Bestimmung von formbeschreibenden Merkmalen aus theoretischen Berechnungen	55
6.4.1. Ermittlung von Durchmesser und Fläche.....	55
6.4.2. Angenäherten Dickenrekonstruktion auf Basis einer geometrisch- optischen Betrachtungsweise.....	60
6.5. Formbeschreibende Merkmale zur Detektierung von Diskozyten und Stomatozyten	68
6.5.1. Stomatozytische Verformung im Intensitätsbild.....	68
6.5.2. Auswahl der Parameter	73
6.5.3. Mittlerer Durchmesser	74
6.5.5. Mittlere Eindelltiefe - Flächenintensitätsstreuung.....	75
6.5.6. Örtliche Eindellung - Lokale Intensitätsstreuung.....	76
6.6. Charakteristische geometrische und Intensitätsparameter von Echinozyten.....	79
6.6.1. Echinozytische Verformung im Intensitätsbild.....	79
6.6.2. Randwelligkeit - Kriterium zur Unterscheidung Stomatozyt - Echinozyt	83
6.6.3. Weitere Parameter	89
6.7. Ermittlung des Formindex aus der Parameterschar	92
6.7.1. Problemstellung und Einordnung des Verfahrens.....	92
6.7.2. Beschreibung des Klassifikatormodells	93
6.7.3. Berechnung des im Merkmalsraum liegenden Hyperbandes	93
6.7.4. Abstandsfunktion und Bestimmung des Formindex	95
6.8. Evaluierung der Methode	96
6.8.1. Vergleich manuelle und automatische Fokusbestimmung	96
6.8.2. Vergleich manuelle Bestimmung der Form und automatische Formdetektierung.....	97
6.8.3. Nachweis der Monotonie der Formklassifikation bei gleichsinnigen Formänderungen	99
6.8.4. Reproduzierbarkeit der Messungen - Einfluß und Eliminierung von Störgrößen.....	101
7. Anwendungen.....	105
7.1. Forminduzierung durch Chlorpromazin und Natriumsalizylat	105
7.2. Ruheform- und induzierte Formänderungen beim Diabetes Mellitus.....	108
7.3. Erythrozyten- Subpopulationen bei Malaria- Erkrankung	110
7.3.1. Bedeutung	110
7.3.2. Ableitung der Formmerkmale	110
8. Zusammenfassung und Ausblick	112
8.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	112
8.2. Ausblick.....	114



Anhang	116
Anhang A: Herleitung der kohärenten Übertragungsfunktion für defokussierte Ebenen	116
Anhang B: Präparation der Erythrozyten	119
Anhang C: Technische Ausrüstung und Daten.....	120
Literaturverzeichnis	123
Abbildungsverzeichnis.....	131



Verzeichnis der verwendeten Symbole

a	Abstand allgemein
d_0	Abstand Objektebene - Objektivenebene
d_i	Abstand Objektivenebene - Bildebene
D	Dicke des Objektes bzw. des Erythrozyten
E_a	Ebene, in der die Lichtintensität beim Dickenrekonstruktionsverfahren betrachtet wird
E_{f_0}	Brennebene des Linsenmodells beim Dickenrekonstruktionsverfahren
E_o	Ebene des Objektes (des Linsenmodells) beim Dickenrekonstruktionsverfahren
f	Brennweite allgemein
f_g	Grenzfrequenz des Lichtes bei der Übertragung am Objektiv
$f(x_0, y_0)$	komplexe Amplitudentransmission des Objektes
$f_A(x_0, y_0)$	reelle Amplitudentransmission des Objektes
$F(f_x, f_y)$	Fouriertransformierte der Objektfunktion
$G(f_x, f_y)$	Fouriertransformierte der Bildamplitudenfunktion
$H(f_x, f_y)$	Übertragungsfunktion
$H_D(f_x, f_y)$	Übertragungsfunktion zur Defokussierung
$H_p(f_x, f_y)$	Übertragungsfunktion Pupillenfunktion
$I_{a.cum}$	Aufsummierte Lichtintensität in der Ebene E_a beim Dickenrekonstruktionsverfahren
I_a	Lichtintensität in der Ebene E_a beim Dickenrekonstruktionsverfahren
I_{cum}	Aufsummierte Lichtintensität allgemein beim Dickenrekonstruktionsverfahren
I_o	Lichtintensität des einfallenden Lichtes beim Dickenrekonstruktionsverfahren
$I_{o.cum}$	Aufsummierte Lichtintensität in der Ebene E_o beim Dickenrekonstruktionsverfahren
$I_t(x_0, y_0)$	Intensitätsverteilung des Lichtes in der Bildebene
k	Wellenzahl $2\pi/\lambda$
M	Vergrößerungsfaktor bei der mikroskopischen Abbildung

N.A.	numerische Apertur des Objektives
$u_e(x_0, y_0)$	komplexe Amplitude der einfallenden Lichtwelle
$u_f(x_f, y_f)$	komplexe Amplitude des Lichtes in der hinteren Brennebene des Objektivs
$u_i(x_i, y_i)$	komplexe Amplitude des Lichtes in der Bildebene
$u_l(x_l, y_l)$	komplexe Amplitude des Lichtes in der Ebene vor dem Objektiv
$u_l'(x_l, y_l)$	komplexe Amplitude des Lichtes in der Ebene nach dem Objektiv
$u_o(x_o, y_o)$	komplexe Amplitude des Lichtes in der Objektebene
x_o	Koordinate in der Ebene E_o beim Dickenrekonstruktionsverfahren
x_{oP}	Koordinate eines beliebigen, aber festen Punktes in der Ebene E_o beim Dickenrekonstruktionsverfahren
x_a	Koordinate in der Ebene E_a beim Dickenrekonstruktionsverfahren
x_{oP}	Koordinate eines festen Punktes in der Ebene E_a , durch den ein Lichtstrahl vom Punkt x_{oP} kommend verläuft beim Dickenrekonstruktionsverfahren
β_1	Neigungswinkel der Oberfläche des Linsenmodells zum einfallenden Lichtstrahl beim Dickenrekonstruktionsverfahren
γ_3	Neigungswinkel des aus dem Linsenmodell austretenden Lichtstrahls zur optischen Achse beim Dickenrekonstruktionsverfahren
γ_{3P}	Neigungswinkel des Lichtstrahls, der durch x_{oP} und x_{aP} verläuft
$\delta\eta$	Brechungsindexdifferenz Erythrozyt/ umgebende Lösung
Δx	Differenz aus x_{aP} und x_{oP}
λ	Wellenlänge des Lichts
φ	Winkel im Polarkoordinatensystem
φ_0	Offset- Winkel im Polarkoordinatensystem
$\varphi(x_0, y_0)$	Phasenverteilung des Objektes



1. Einleitung

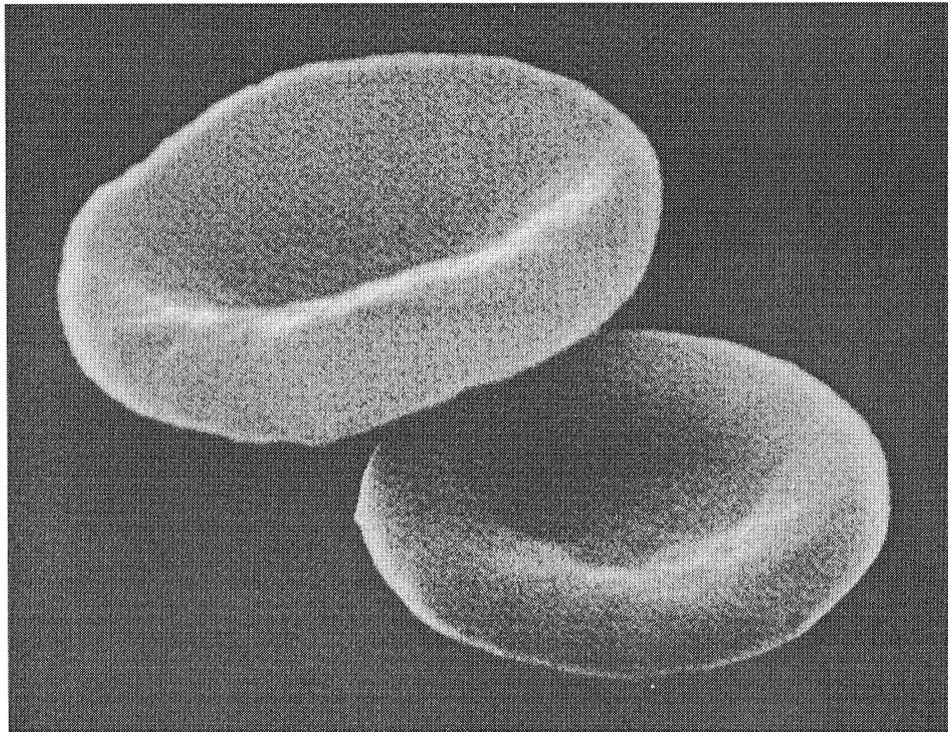


Abb. 1-1:

Erythrozytenpärchen im Elektronenmikroskop

Der Erythrozyt ist in verschiedener Hinsicht ein beeindruckendes Beispiel für die vielfältigen Ausdrucksmöglichkeiten des Organismus. Seine Form stellt ein Spiegelbild des empfindlichen physikalisch- chemischen Kräftegleichgewichts zwischen Membran, innerem und äußerem Milieu des Blutkörperchens dar.

Ausgehend von der charakteristischen Ruheform des Erythrozyten, der bikonkaven Scheibe, lassen sich zwei Typen von Formänderungen beobachten. Zum einen bildet die Membran eine zunehmende Anzahl von Ausstülpungen (Echinozytose) aus, zum anderen erfährt die Membran eine sich immer tiefer in den Erythrozyten hineinwölbende Einbuchtung (Stomatozytose). Die Endstadien beider Änderungsmöglichkeiten sind durch eine Kugelform (Spheroechnozytose bzw. Spherostomatozytose) mit stachelartigen Ausstülpungen oder Vesikulierung nach innen beschreibbar.



Diese Formänderungen sind einerseits Ausdruck pathologischer Veränderungen bei hämolytischen Anämien (Kugelzellanämie, Sichelzellanämie), andererseits lassen sie sich durch eine Änderung des Umgebungsmilieus herbeiführen. In letzterem Fall kann eine veränderte Stärke und Geschwindigkeit der Formänderung im Vergleich zum Normalen wiederum Ausdruck verschiedener krankhafter Veränderungen der Erythrozyten und ein beschreibendes Merkmal zur Beurteilung der Geschwindigkeit sich bei Formänderungen abspielender Umverteilungen von Molekülen in der Membran sein.

Das Interesse bei der Auswertung der Erythrozytenform geht folglich in zwei Richtungen:

Die Formbestimmung unbehandelter oder mit einer formändernden Substanz behandelter Erythrozyten ist als zukünftiges Hilfsmittel bei der Diagnose bestimmter Krankheitszustände denkbar.

Das Blutkörperchen läßt sich als allgemeines Membranmodell auffassen. So kann das Studium von Formänderungen nach Änderung des Umgebungsmilieus sowohl eine genauere Modellierung der Membran als auch Rückschlüsse auf die formändernde Substanz ermöglichen. Hierbei spielt die Auswertung kleinerer Abweichungen von der Normalform eine wichtige Rolle.

Zur Erfüllung dieser Ansprüche an die Formbestimmung ist ein Verfahren notwendig, welches einen minimalen Aufwand bei der Probenpräparation und deren geringste Beeinflussung vor und während der Messung, sowie ein ausreichendes Signal zur Differenzierung kleiner Formunterschiede ermöglicht.

Diese beiden Kriterien schließen sich nahezu aus. Als Beispiel seien die Elektronenmikroskopie mit dem extrem hohen präparativen, die Probe stark beeinflussenden Aufwand aber derzeit höchst erreichbarer Auflösung und die durchflußzytometrischen Meßgeräte (Coulter Counter) mit geringstem präparativen Aufwand und ungenügender Formaflösung für Erythrozyten genannt.

In dieser Arbeit wird ein Verfahren vorgestellt, welches auf Grundlage lichtmikroskopischer Aufnahmen mittels Bildverarbeitung eine automatische Formklassifizierung einzelner Erythrozyten gestattet. Da die entstehenden Bilder in Abhängigkeit der Fokusebene keineswegs eindeutig in Bezug auf die Form sind, wird eine Methode gezeigt, welche die Lichtverteilung in defokussierten Ebenen benutzt, um eine eindeutige Klassifikation basierend auf mehreren Form- und Intensitätsparametern zu ermöglichen. Für die rotationssymmetrischen Formen der roten Blutkörperchen wird ein Verfahren vorgestellt, das eine annähernde Dickenrekonstruktion der jeweiligen Form gestattet.



2. Die Form des Erythrozyten und seine Bedeutung

2.1. Aufbau und Ruheformspektrum

Das rote Blutkörperchen, im Englischen als Erythrocyte oder Red Blood Cell bezeichnet, nimmt eine Sonderstellung unter den Zellen des menschlichen Körpers ein: Neben seiner freien Beweglichkeit ohne Zellverband ist sein Aufbau ohne Zellkern und sonstige Zellorganellen auffällig. Es besteht aus der umhüllenden Membran und dem Zytosol, dessen Hauptbestandteil Hämoglobin ist. Dieser einfache Aufbau und eine relativ leichte Verfügbarkeit prädestinieren den Erythrozyten als Objekt für Membranuntersuchungen.

Der Lipidbilayer ist das Grundgerüst der Erythrozytenmembran mit einer Dicke von ca. 4 nm, bestehend aus Phospholipidmolekülen und Cholesterin, wobei nur die hydrophilen Kopfgruppen mit der umgebenden Flüssigkeit in Berührung kommen. Es sind ca. 400 unterschiedliche Phospholipidgruppen bekannt, die am Aufbau von biologischen Membranen beteiligt sind. Sie liegen asymmetrisch verteilt in den beiden Lipidschichten des Bilayers.

Die Glycokalix ragt in das äußere Medium hinein, d.h. in die Suspension oder in das Serum. Sie besitzt eine negative Nettoladung infolge von Sialinsäureresten, die unter physiologischen Bedingungen vollkommen dissoziiert sind. Auf diese Weise entsteht ein Oberflächenpotential. Diese Ladungen bestimmen zusammen mit den Dipoleigenschaften der hydrophilen Anteile der Phospholipide die elektrostatischen Eigenschaften der äußeren Membranoberfläche. Sie lassen sich mit Einschränkungen als eine kontinuierliche Oberflächenladung der Membran beschreiben.

Das Zytoskeletton befindet sich an der Membraninnenseite. Es besteht hauptsächlich aus Proteinen, Spektrin und Aktin, die über verschiedene Bindungsproteine an die integralen Proteine der Membran geknüpft sind.

Der Erythrozyt entsteht über das Zwischenstadium des Retikulozyten im roten Knochenmark. Dabei entwickelt sich aus der unregelmäßig globulären Form unter Abnahme des Volumen-Oberflächenverhältnisses die typische symmetrische diskozytische Normalform des Erythrozyten [Bes77].

Voraussetzung für diese Form ist ein Oberflächenüberschuß, der sich in einem erhöhten Oberflächen- Volumenverhältnis beim Erythrozyten (ca. $1,4 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) gegenüber einer volu-

mengleichen Kugel (ca. $1 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) ausdrückt [Eva70]. Wirken äußere Kräfte, z.B. Scherkräfte in Strömungen, auf den Erythrozyten ein, verändert dieser in Abhängigkeit der Belastung seine Form, schnell aber nach abruptem Stop der Strömung innerhalb kürzester Zeit (typisch 100 ms) in seine Ausgangsform zurück [Art88a, Art95b].

Ohne wesentliche Änderung des Volumen- Oberflächen- Verhältnisses kann der Erythrozyt seine Form in zwei verschiedene Richtungen ändern [Deu68]. Zum einen entwickeln sich auf seiner Oberfläche Vorwölbungen, die mit zunehmender Ausprägung der Formänderung an Anzahl zunehmen und deren Durchmesser sich immer weiter verkleinert. Die Endgestalt dieser als Echinozytose bezeichneten Formänderung ist nahezu kugelförmig. Andererseits bildet sich aus einer Eindellung des Erythrozyten eine immer tiefer werdende Einbuchtung der Membran aus, Stomatozytose genannt. Auch diese Änderung gipfelt in einer sphärischen Endform.

Diese beiden Arten der Formänderung wurden von BESSIS [Bes77] in Zwischenformen klassifiziert und als ein kontinuierliches Spektrum dargestellt.

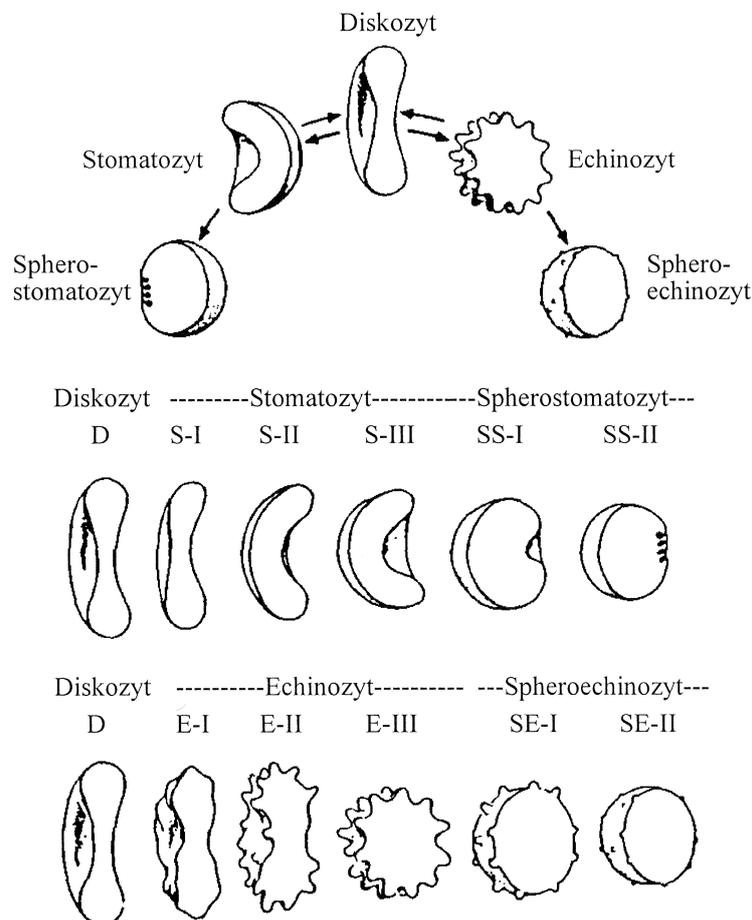


Abb. 2-1:

Ruheformklassifizierung nach BESSIS

Neben der in Abbildung 2-1 angegebenen Bezeichnung wird auch die Formcharakterisierung mittels Formindex verwendet. Die Tabelle 2-2 zeigt die Zuordnung zwischen BESSIS- Formbeschreibung und Formindex.

Form	SS-II	SS-I	S-III	S-II	S-I	D	E-I	E-II	E-III	SE-I	SE-II
Index	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5

Abb. 2-2:

Zuordnung zwischen BESSIS- Klasseneinteilung und Formindex

Andere Änderungen der Ruheform resultieren aus einer Änderung des Erythrozytenvolumens, z.B. hervorgerufen durch Änderung der Osmolarität.

2.2. Ruheform und Lipidbilayer

Schon bald, nachdem man Zellen unter dem Mikroskop betrachten konnte, wurde versucht, die charakteristische Ruheform des Erythrozyten zu erklären. So vermutete HALLER 1757 [Hal57], seine Form sei die Folge fortlaufender "Abschleifungsvorgänge" in den Gefäßen. So sehr diese naive Vorstellung heute belächelt wird, es herrscht bis heute keine restlose Klarheit über diese Formentstehung. Ausgehend von den histologischen Untersuchungen, die selbst im Elektronenmikroskop nur eine "gleichförmige granuläre Struktur" [Wal67] erkennen lassen, konnten bis jetzt nur Hypothesen über die Kräfte, die diese Form aufrechterhalten, aufgestellt werden.

Das "fluid mosaic"- Modell ist grundlegend für das heutige Verständnis vom Aufbau der Membran [She74], reicht aber nicht aus, die Ruheform des Erythrozyten und auftretende Formänderungen völlig zu erklären. Einigkeit herrscht darüber, daß die bikonkave Form ein Minimum der in der elastischen Membran gespeicherten Energie widerspiegelt [Can70]. In [Deu76] wird dafür als Ursache eine negative Vorkrümmung (Hervorwölbung der Innenseite) der Erythrozytenmembran postuliert, ohne daß dafür die physikalisch- chemischen Ursachen geklärt wären.

Aus dem Aufbau des Erythrozyten wird jedoch ersichtlich, daß die formgebenden und formstabilisierenden Eigenschaften im engsten Zusammenhang mit der Membran (Lipidbilayer und Zytoskeletton) zu suchen sind.

Eine teilweise Erklärung für die stomatozytische und echinozytische Formänderung lieferten SHEETZ und SINGER [She74] mit ihrer "bilayer couple"- Theorie, die davon ausgeht, daß sich die Form des Erythrozyten in Richtung Stomatozytose / Echinozytose durch Einlagerungen (Flächenänderung) von Molekülen an den inneren / äußeren Teil seiner Doppelmembran ändert. Dieses Erklärungsmodell wurde bezüglich der Rolle des unter der Doppelmembran liegenden Spektrinnetzes erweitert [Schmi83].