

## Marktübersicht "Biological Imaging"

### Ein Bild ist mehr als 1000 Worte...

Walter Steffen und Dieter G. Weiss  
 Institut für Zellphysiologie und Biosystemtechnik,  
 und Zentrum für lichtmikroskopische Meß- und Beobachtungsverfahren,  
 Fachbereich Biologie, Universität Rostock

Biologische Sachverhalte sind fast immer mehrdimensional und erfordern daher zur adäquaten Darstellung zwei- bis mehrdimensionale bildgebende Verfahren. Die Information über eine Metabolitkonzentration interessiert nur in Zusammenhang mit den Fragen: in welchem Organ? in welcher Zelle? in welchem intrazellulären Kompartiment? zu welchem Zeitpunkt der Embryonalentwicklung? etc etc. Biologische Information kann nur im richtigen Zusammenhang erfaßt und bewertet werden, wenn Meßergebnisse so abgebildet werden, daß die Darstellung dieser Komplexität Rechnung trägt. Ein zweidimensionales Bild (z.B. mikroskopischer Schnitt; x und y) ist das Minimum. Sofort will man wissen, wie sieht es dreidimensional aus, wie verteilen sich Organe, Substanzen, Genexpression in den anderen Ebenen (z-Richtung)? Dreidimensionale Bilder sind aber nicht genug. Fast immer muß man, codiert in Grauwerten oder Farben, Mengenangaben machen (Dichte, Konzentration, Häufigkeit von Silberkörnern, Zellzahl etc), um die Sachverhalte adäquat zu beschreiben. Und dann ist da noch die Dynamik biologischer Systeme: die Regulation, die Veränderung, die Bewegung, der Metabolismus, vieles verändert sich zeitabhängig und muß in Zeitserien von 2-dimensionalen oder 3-dimensionalen Bildern, also als Film dargestellt werden. Verschiedene zell- und molekularbiologische Zeitschriften veröffentlichen daher zu den gedruckten Artikeln seit geraumer Zeit Videokassetten als Supplement oder Videosequenzen in den Internet-Ausgaben (z.B. Cell, Cell Motility and the Cytoskeleton, Journal of Cell Biology).

Bildgebende Verfahren haben daher heute in den molekularen, zellulären und physiologischen Disziplinen einen Stellenwert erlangt, der es unvermeidlich macht, sich mit den Software- und Hardware-Werkzeugen zur Erstellung qualitativ hochwertiger Bilder zu befassen. Die Dokumentation der Meßergebnisse, die Verarbeitung der Bilddaten und die Präsentation in publizierbarer Qualität beschäftigen den Biologen mehr und mehr, und der rasante technische Fortschritt führt zu einer schier unüberschaubaren Vielfalt von Angeboten, die nicht Wenige verwirrt. Wir hoffen mit dieser Übersicht einige Punkte etwas klarer zu machen.

#### 1. Vielfältigkeit der Einsatzbereiche

Es gibt keine praktikable und bezahlbare Allround-Lösung für alle Imaging-Probleme im Biologielabor. Neben Ausrüstungen, die für mehrere Anwendungen geeignet sind, werden vor allem Speziallösungen angeboten. Das Haupteinsatzgebiet ist in jedem Fall die *Mikroskopie*, die heute nicht nur abbildend sondern messend arbeitet, d.h. die einzelnen Bildpunkte sind Meßwerte (siehe BioSpektrum 5/98). Daneben ist ein weiteres Gebiet die *Gelelektrophorese* [1]. Trotz grundlegender Gemeinsamkeiten bei den Verfahren der Bildanalyse sind für Mikroskopie und Gelelektrophorese bereits so verschiedene Auswerteverfahren erforderlich, daß die angebotenen Programmpakete nicht wechselweise verwendbar sind. Die Bearbeitung und Analyse von 2-D-Gelen, erfordert so spezielle Technik, daß sie hier nicht erschöpfend behandelt werden kann. Ähnlich ist es mit dem Radio Imaging, also der Analyse von Radioaktivitätsverteilungen im histologischen Schnitt, die meist über eine flächenbezogene Quantifizierung von Silberkörnern durchgeführt wird.

Reine *Dokumentation* von großen Anzahlen von Bildern in meist hoher Auflösung in Bild-Datenbanken ist ein weiteres Einsatzgebiet. Softwarepakete zur effizienten Verwaltung dieser Bilder werden angeboten, wobei die Geschwindigkeit der Suchprogramme und der Komfort bei der Darstellung von Bildergruppen („gallery“) zur Überprüfung und zum Vergleich am Monitor die Hauptqualitätsmerkmale darstellen. Als Aufnahmegeräte kommen fast alle Arten in Frage, vor allem aber hochauflösende Farb-CCDs und Zeilencameras mit 1012, 2024 oder mehr Pixeln (=picture elements) je Zeile. Ein wichtiges Gebiet ist die Dokumentation von Karyogrammen, die in großer Zahl und mit einer hohen Genauigkeit archiviert und analysiert werden müssen.

Das Hauptgebiet ist aber der Bereich der *Videomikroskopie*. Darunter versteht man die Techniken, bei denen durch eine Kombination des Mikroskops mit hochwertigen Camera-Rechner-Einheiten neue Bildinhalte dargestellt werden können, die dem bloßen Auge nicht zugänglich waren. Die drei Gebiete, die sich vor allem in der Art der Bildaufnahmetechnik, nicht so sehr in der Bildverarbeitung unterscheiden

sind: 1. Video-Kontrastverstärkungs-Mikroskopie [video-enhanced contrast (VEC) microscopy], 2. Restlicht-Mikroskopie [video-intensified microscopy (VIM)] und 3. die konfokale Rastermikroskopie. Die elektronische Lichtmikroskopie wird wegen der großen Bedeutung in der Biologie in neuen zusammenfassenden Darstellungen ausführlich behandelt [2-5].

Technisch sind drei Bereiche zu unterscheiden: *Aufnahmegeräte* (Video-Cameras und charge-coupled-devices (CCDs)), *Interface-Karten oder Frame Grabber*, die die Rohbilder vorverarbeiten und an den Computer weitergeben und die *Bildverarbeitungssysteme*, die teilweise als reine Software-Lösung für alle gängigen Rechner erhältlich sind, teilweise aber durch Hardware dramatisch unterstützt werden. Diese Hardware kann entweder in den Frame Grabber integriert sein, oder sie wird als Paket mit der Software angeboten, oder sie ist als Zusatzboard realisiert. Ähnlich variabel sind auch die Cameras und ihre Interface-Möglichkeiten. Viele CCDs haben ihre eigene Hardware, mit der digitale Bild direkt in den Speicher des Rechners abgebildet wird, während andere Camera-Hersteller darauf vertrauen, daß der Kunde einen der geeigneten Allzweck-Frame Grabber findet, mit denen die Bildformate vieler verschiedener Cameratypen und verschiedene Videoformate in den Rechner überführt werden können. Die Anwendungsgebiete sind so verschieden, daß versucht wurde in den nachfolgenden Tabellen zu jedem Produkt die Einsatzbereiche abzufragen.

#### 2. Analog oder digital? das ist die Frage

Elektronische-Bilder enthalten die Information über die Intensität entweder in analoger Form oder digitaler Form kodiert:

**analog:** durch die Video-Camera wird die Helligkeit eines jeden Bildpunktes in einen Spannungswert umgewandelt. Das analoge Signal ist ein kontinuierliches Signal, bei dem 0,4 V schwarz und 1 V weiß repräsentiert. Das Signal wird unterbrochen durch Synchronisationssignale, die die Zeilenenden und Enden der Halbbilder (fields) festlegen. Üblicherweise besteht ein Bild (frame) aus 576 sichtbaren Linien (europäischer Standard, CCIR) aufgeteilt auf zwei Halbbilder (fields) von denen eines die geradzähligen und eins die ungeradzähligen Zeilen enthält.

**digital:** mit einem Analog-Digital-Converter (A/D) wird das kontinuierliche Videosignal in diskrete Zahlenwerte umgewandelt, die dem so entstehenden Block von Bildpunkten (Pixeln) zugeordnet werden. Ein übliches Bildformat ist 768 x 576, d.h. 768 Pixel pro Zeile und 576 Zeilen. Wenn eine 8bit-Umwandlung gewählt wird, erhält man Bilder mit 256 Grauwerten, wobei 0 für schwarz und 255 für weiß steht. Werden die Bilder nicht durch Video-Cameras sondern durch CCDs aufgenommen, liegen sie primär bereits in digitaler Form vor und können direkt in den Computer übernommen werden. Um sie aber an andere Geräte wie Monitor oder Videorecorder zu übertragen, wer-

den sie meist wieder in ein analoges Videosignal überführt (D/AC).

Durch analoge Bildverarbeitung kann der Kontrast *elektronisch* bis mehrhundertfach verstärkt werden. Durch digitale Bildverarbeitung wird der Kontrast *numerisch* verstärkt, wobei die obere Grenze sinnvoller Kontrastverstärkung nur bei einem Faktor von etwa dreifach liegt. Aber die Bildqualität kann auf digitale Weise durch eine Vielzahl von anderen Algorithmen dramatisch verbessert werden. Bilder können stets entweder analog oder digital entstehen, verarbeitet, gespeichert, als Hardcopy ausgedruckt werden und als analoge oder digitale Videoserien zusammengestellt, editiert und gespeichert werden. Beide Arten sind wichtig, digitale Techniken allein ermöglichen nur einen Teil der Anwendungen.

### 3. Videomikroskopie

Drei Hauptstrategien digitaler und analoger Bildverarbeitung haben zu einer neuen Blüte der Lichtmikroskopie in Form der Videomikroskopie geführt.

#### 3.1. Video-Kontrastverstärkungs-(VEC)-

##### Mikroskopie

Mit dieser Methode wird der Kontrast in Bildern mit schwachem Kontrast (flaues Bild) elektronisch verstärkt. Dadurch werden nicht nur die sichtbaren Details verstärkt sondern es werden auch Strukturen sichtbar, die 5-20x kleiner sind als die konventionelle Detektionsgrenze. Eine zusätzliche optische Vergrößerung ist dabei sinnvoll und notwendig (4x). Durch diese Kontrastverstärkung werden auch Objekte jenseits der Auflösungsgränze sichtbar. Biologische Objekte von 15-20 nm und colloidale Goldpartikel von 5 nm können im Bezug auf Position und Bewegung analysiert werden. Die VEC-Mikroskopie ist besonders nützlich für Zellbiologen, Biochemiker und Molekularbiologen,

- weil dadurch Objekte kleiner als die klassische Auflösung sichtbar werden (z.B. Mikrotubuli, synaptische Vesikel etc.),
- weil Organellen und größere Proteinkomplexe in lebenden Zellen untersucht werden können,
- und weil unter bestimmten Umständen quantitative Messungen von Mengen, Konzentrationen, Transport oder Metabolismus möglich sind.

Analoge Bildverstärkung erfolgt auf der Stufe des analogen Camerassignals. Durch ihre Einführung wurde eine neue Qualität der Lichtmikroskopie erreicht. Da die analoge Kontrastverstärkung nicht durch die digitale ersetzt werden kann, sind dafür besonders geeignete Cameras erforderlich. Als Grundregel gilt, daß nur analog verstärkte und optimierte Bilder digitalisiert und weiterverarbeitet werden sollten (weitere Details siehe [6]).

#### 3.2. Restlichtmikroskopie

Die Fluoreszenzfärbung dominiert heute die biologische Mikroskopie, sie liefert aber nur

sehr lichtschwache Bilder. Zur Dokumentation bei dieser Anwendung sind hochempfindliche Videocameras und CCDs entwickelt worden, die in ihrer Empfindlichkeit den photographischen Film und das menschliche Auge übertreffen. Hauptanwendungsgebiete sind die Fluoreszenzmikroskopie von endogenen Fluoreszenzverbindungen (NADPH, Chlorophyll), von exogenen Farbstoffen (Ion Imaging, organellenspezifische Farbstoffe) und von fluoreszenzmarkierten Antikörpern und Green Fluorescent Protein sowie die Lumineszenz ( $O_2$ -Radikale, ATP-Messung). Die für Restlichtmikroskopie geeigneten Cameras sind so empfindlich, daß Belichtungszeiten unter einer Sekunde ausreichen, wo selbst empfindliche Filme (400-800 ASA) eine halbe bis eine Minute benötigen. Durch die kurze Belichtungszeit wird das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes maßgeblich vermindert. Statt *einer* Aufnahme können so *viele* Aufnahmen gemacht werden. Zusätzlich wird es durch den Einsatz von geringeren Farbstoffmengen möglich, unter für Zellen weniger toxischen Bedingungen zu arbeiten.

#### 3.3. Digitale Bildverarbeitung

Viele biologische Prozesse und Objekte lassen sich nur durch Rechenprozesse, die an den aufgenommenen, analog verstärkten Rohbildern vorgenommen werden, darstellen. Erforderlich sind hierfür Frame Grabber, die entweder Einzelbilder aus der Serie der einlaufenden Videobilder herausgreifen, mit einem Analog-Digital-Converter (A/DC) digitalisieren und direkt oder nach weiteren Bearbeitungsschritten speichern. Die gleichen Verfahren können nochmals auf gespeicherte, digitalisierte Einzelbilder angewandt werden. Zur Bildnachbearbeitung werden weitere Algorithmen angewandt, die in den gängigen Bildbearbeitungsprogrammen enthalten sind. Dazu gehören Morphometrie-Verfahren (Darstellung quantitativer Daten entweder im Bild oder als Datensatz), digitale Filterungen, Hintergrund-Subtraktion, Bildmittelung zur Rauschunterdrückung und Mehrbild-Operationen (Differenzbilder, Bilddivision bei Ratio Imaging). Eine Übersicht über alle Verfahren findet man bei Russ [7]. Seitdem viele dieser Operationen mit Videofrequenz (25 oder 30 mal pro Sekunde) durchführbar geworden sind, ist es mit den anspruchsvolleren Soft- und Hardwarelösungen sogar möglich, digital verbesserte und bearbeitete Bildsequenzen als Videofilm aufzunehmen.

Bei der Digitalisierung wird das Bild in Pixel (picture elements) aufgeteilt, denen eine von 256 Graustufen (bei 8bit Digitalisierung) zugeordnet wird. Je nach Schwierigkeit der folgenden Operationen benötigt man ein bis drei Bildspeicher mit typischerweise 512x512 oder 768x576 Pixel. Wenn Bildmittelung oder andere Mehrbild-Operationen gewünscht sind, muß der Bildprozessor (ALU, arithmetic logical unit) mindestens für 16bit-Verarbeitung ausgelegt sein.

Die xy-Auflösung des Videobildes ist viel schlechter als die vom photographischen Film. In einem Kleinbildnegativ entspricht die Auflösung etwa 5000 Zeilen. Vergleichbare Auf-

lösungen (4096x4096) werden zwar von CCD- und Zeilencameras erreicht, aber die Bildverarbeitung solcher Bilder wäre extrem aufwendig.

### 4. Bildaufnahme: Videocameras und CCDs

Im wesentlichen werden vier Arten von Bildaufnahmegerten verwendet, je ein analoger (Röhrencamera, Vidicon, Newicon) und ein digitaler Typ (charged coupled device, CCD) für hochauflösende und Kontrastverstärkungsmikroskopie, und für die Restlichtmikroskopie ein analoger Camera-Typ (verstärkte Röhrencamera, silicon intensifier target = SIT) und als digitales System, CCDs, die entweder durch eine zweite Huckpack-Camera verstärkt werden (intensified CCD) oder in ihrer Empfindlichkeit durch starke Kühlung zur Rauschunterdrückung wesentlich verbessert sind (cooled CCD, slow scan cameras).

#### 4.1. Einfache Bildaufnahme

Sollen Bilder einfach aufgenommen werden, um sie direkt der Dokumentation oder Archivierung zuzuführen, ohne daß große Anforderungen an die Bildverbesserung gestellt werden, genügen einfache CCD-Chip Cameras. Ein- oder Dreichip- Farbcameras haben sich in der Histologie zur besseren Unterscheidung der Färbungen bewährt.

#### 4.2. Hochauflösende- und Kontrastverstärkungsmikroskopie (VEC)

Bis vor kurzem wurden für die VEC-Mikroskopie ausschließlich Röhrencameras (3/4 und 1 Zoll Newvicon, Chalnicon, Vidicon) verwendet, die es in Ausführungen mit hoher Empfindlichkeit im UV-, Rot-, Infrarot- und Röntgen-Bereich gibt (Hamamatsu Photonics, DAGE-MTI, Inc.). Erst in den letzten Jahren wurden CCDs im Bezug auf Auflösung und Empfindlichkeit so gut, daß sie sich als Alternative durchsetzen. Röhrencameras werden aber auch heute noch überall dort verwendet, wo es auf hohe analoge Kontrastverstärkung ankommt. Dazu muß die Camera mit einer Kontrolleinheit ausgerüstet sein, die die *manuelle* Einstellung von „gain“ und „offset“ (Kontrastverstärkung und Helligkeit) erlaubt. „Automatic gain control“ (AGC) verhindert die sinnvolle Anwendung der Kontrastverstärkung.

#### 4.3. Aufnahme von Fluoreszenzbildern:

##### Restlichtcameras

Für die Fluoreszenz- und Lumineszenz-Abbildung sind die oben genannten Cameras ungeeignet. Stattdessen kommen SIT-Cameras immer dann zum Einsatz, wenn Bildsequenzen in Videofrequenz erforderlich sind, und gekühlte CCDs, wenn brillante Einzelbilder oder Sequenzen mit größeren Intervallen aufgenommen werden sollen.

*SIT Cameras* bestehen aus zwei funktionellen Einheiten, dem Image Intensifier und der

Videocamera, die in einer Glasröhre zusammengefaßt sind. Der Intensifier nimmt das Bild auf, verstärkt das Signal und gibt das Resultat an die Videocamera weiter, die es im Video-Bildformat ausgibt. SIT-Cameras sind etwa hundertmal empfindlicher als einfache Röhrencameras, aber diese Verbesserung muß mit einer viel geringeren örtlichen Auflösung durch das Rauschen dieses Camera-Typs erkauft werden. Das Rauschen kann durch Bildmittelung (rolling average) über 8 bis 64 Bilder dramatisch reduziert werden. Es können so langsamere, dynamische Effekte direkt verfolgt und als Videofilm aufgezeichnet werden. Standbilder können durch Akkumulation von Bildern im Bildspeicher oder durch Mittelung über 128 oder 256 Bilder mit hoher örtlicher Auflösung aufgenommen werden, wenn das Objekt keine Bewegung zeigt. Doppelt verstärkte SIT-Cameras (ISIT) arbeiten auch bei Lichtmengen an der Grenze des menschlichen Sehens. SIT und ISIT-Cameras werden meist mit Multialkali-Photokathoden hergestellt, so daß sie im gesamten Bereich von 300-850 nm einsetzbar sind.

Zahlreiche alternative Cameratypen entstehen durch die Kombination von Intensifiern, „microchannel plates“ und CCDs oder Röhrencameras, wobei häufig ein primäres Bild auf einen Phosphorschirm entworfen wird, das dann mit einer optischen Übertragung (z.B. Glasfaser) auf eine Camera übertragen wird. Mehrstufige Systeme erreichen Verstärkungsfaktoren über eine Million, so daß „Photon Counting“ Cameras für extrem geringe Lichtmengen entstehen. Schwache Lumineszenzen können so aufgezeichnet werden, wobei die Grenze bei 1-10 Photonen pro Sekunde und  $\text{mm}^2$  am Cameratarget liegt. In diesen Fällen sind allerdings Expositionszeiten bis in den Stundenbereich erforderlich.

Gekühlte CCDs werden eingesetzt, wenn Fluoreszenzen mit hoher örtlicher und geringer zeitlicher Auflösung abgebildet werden sollen. Mit Belichtungszeiten im Sekundenbereich können diese Cameras nicht mit Videofrequenz arbeiten. Da über einen längeren Zeitraum Photonen akkumuliert werden müssen, ist externe Kühlung mit Peltier-Elementen oder flüssigem Stickstoff auf  $0^{\circ}$  bis  $-125^{\circ}\text{C}$  erforderlich, um das Rauschen zu unterdrücken. Sie werden daher als „slow scan cameras“ oder „cooled CCDs“ bezeichnet. Diese Cameras zeichnen sich durch gute Meßgeometrie, großen dynamischen Bereich, photometrische Genauigkeit und hohe Quantenausbeute aus, und sind deshalb für quantitative Fluoreszenzaufnahmen statischer Objekte die Detektoren der Wahl.

Gekühlte CCDs benötigen zum Transfer der Bilder ein spezifisches Interface (image acquisition board), das die meisten Hersteller wahlweise für PC oder Macintosh liefern. Der verwendete Rechner sollte über einen schnellen Prozessor, mindestens 128 MByte RAM und 2 GByte Festplattenspeicher verfügen. Viele Hersteller liefern zu dem Interface nicht viel mehr Software als zur Bildübertragung nötig ist. Es besteht aber immer Bedarf an weiterer Bildverarbeitung wie der Darstellung von Serien, Kombination einzelner Bilder bei verschiedenen

Wellenlängen bei Mehrfachfluoreszenz (Abbildung 1), Nachbearbeitung des Kontrasts, Falschfarbendarstellung etc. Hier eignen sich Softwarepakete wie zum Beispiel MetaMorph, IPLab Spectrum, oder NIH Image, die die Bildformate mehrerer gängiger CCDs akzeptieren. Besonders günstig ist die Fähigkeit der meisten dieser Programme auch das Mikroskop und die Peripheriegeräte zu steuern. So können bei Mehrfachfluoreszenz die Filterwechsler automatisch betrieben, die Bildwiederholfrequenz eingestellt, das Präparat durch den Verschluss einer Blenden vor dem Ausbleichen geschützt, und die Bildaufnahme auf PC oder Bandgeräte gesteuert werden. Ist dies nicht gewünscht, so genügen auch Standard-Bildverarbeitungspakete wie PhotoShop oder Paint Shop Pro.

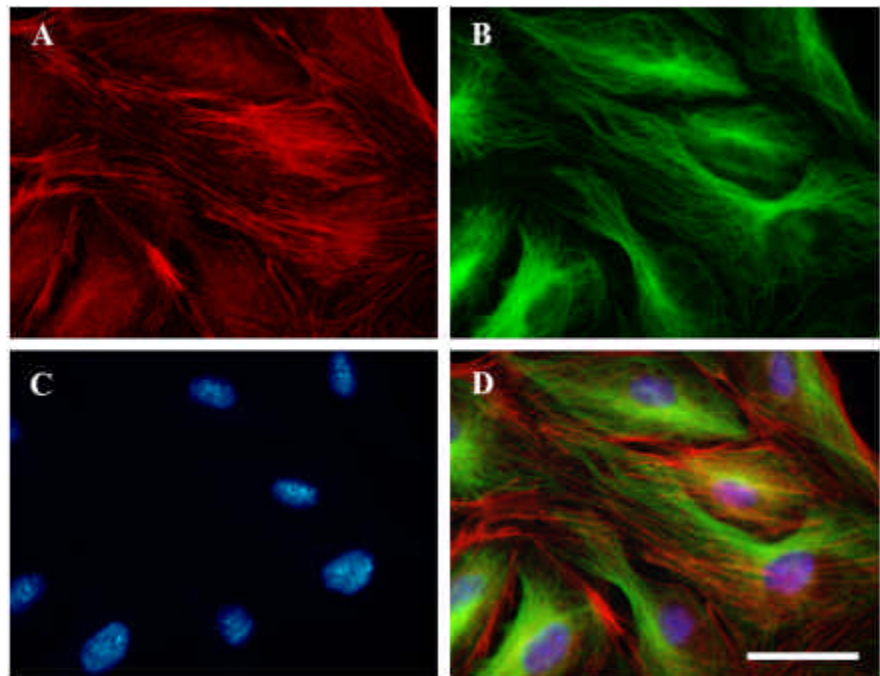
Da sich die Bildaufnahmegeräte, vor allem die CCDs, in so vielen Parametern unterscheiden,

## 5. Bildverarbeitungssysteme

Wenn man von Systemen für die Bildverbesserung spricht, so muß man auch hier zwischen analogen und digitalen Verfahren unterscheiden. Die größte Verbesserung wird man immer dann erzielen, wenn man beide Verfahren kombiniert, wobei zu bemerken ist, daß das Analogverfahren ein essentieller Bestandteil jeglicher Videomikroskopie darstellt.

### 5.1. Analoge Bildverarbeitungssysteme

Bei der analogen Bildverbesserung wird durch das Eintellen von „gain“ und „offset“ die Sichtbarkeit feinsten Details erzielt. Diese Funktion ist in der Regel Teil der Camerakontrolleinheit. In manchen Systemen ist die analoge Kontrastverstärkung in der Frame-Grabber-Karte



**Abbildung 1:** Mehrfachfluoreszenzmarkierung von PtK<sub>2</sub>-Zellen. (A) Aktinfilamente wurden mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt, (B) Mikrotubuli wurden mit einem monoclonalen anti- $\alpha$ -Tubulin nachgewiesen und mit einem Texas-Rot-gekoppelten Sekundäntikörper detektiert. (C) Hoechst-33258-Färbung der Kern-DNA. (D) Kombination der Bilder A – C durchgeführt in PhotoShop im RGB-Modus. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem gekühlten, slow-scan CCD-System (SenSys, Photometrics) aufgenommen. Vergrößerungsbalken 50  $\mu\text{m}$ .

ist es fast zu einer Wissenschaft für sich geworden eine optimale Camera auszuwählen. Eine ausführliche Darstellung der zu beachtenden Parameter und ihrer praktischen Bedeutung wurde von einer Initiativgruppe aus führenden Cameraherstellern zusammengestellt [8]. Auf eine besonders umfangreiche Übersicht über mehr als 100 Cameras vom Herbst 1998 [9] und einen eingehenden Vergleich zwischen gekühlten CCDs und Intensified Cameras [10] sei hingewiesen.

integriert. Es gilt hier zu beachten, daß sich Camera-Kontrast und Helligkeit manuell einstellen lassen müssen.

### 5.2. Kompakte digitale Bildverarbeitungssysteme

Kompakte digitale Bildverarbeitungssysteme bestehen aus einer Kontrolleinheit mit der sowohl analoge als auch digitale Bildverbesserung durch geführt werden können. Um videomikroskopische Bilder von höchster

Qualität zu erzeugen, stellen diese Systeme die kostengünstigste Lösung dar. Die gewünschte Bildqualität wird zusätzlich zur analogen Bildverbesserung durch eine digitale Bildverarbeitung mit Funktionen zur Hintergrundsubtraktion und Mittelung etc., die in Videofrequenz durchgeführt werden können, erreicht. Die Geräte der Argus-Reihe von Hamamatsu Photonics sind Geräte, die diese Voraussetzungen erfüllen.

### 5.3. PC-gesteuerte Bilderverarbeitungssysteme

Durch die dramatische Verbesserung der Computertechnologie lassen sich Bilderfassung und Bildverarbeitung heute auch am PC durchführen. Dies wurde durch Erhöhung der Rechengeschwindigkeit und der Speicherkapazität, sowie durch die Einführung von Analog-Digital-Convertern auf schnellen Frame-Grabber-Karten ermöglicht. Durch die stark verbesserte Leistungsfähigkeit der Computer können nun nicht nur Einzelbilder und Videosequenzen aufgenommen und direkt verarbeitet werden. Einige „high-end“-Systeme erlauben zusätzlich die Anwendung Pixel-bezogener Bildverarbeitungsalgorithmen (z.B., Fourier-Transformationen) oder Zwei- und Mehrbildverarbeitungsverfahren („ratio imaging“ und 3D Darstellung)

Ein PC-gesteuertes System sollte neben dem oben Genannten auch die Möglichkeit zur Steuerung der gängigsten Camera-Typen und sonstiger Zusatzgeräte wie Fokussmotor, Verschlussblende, Mikroskoptisch und Filterwechsler haben. Außerdem ist die Möglichkeit zur synchronen Steuerung von ein oder zwei Videorekordern mit Camera und Blendenverschluss von großer Bedeutung, wenn Fluoreszenzsignale parallel zu Bildern hoch auflösender Techniken wie differentieller Interferenzkontrast aufgenommen werden sollen. Durch eine entsprechende Verschlusssteuerung lassen sich bei der Aufnahme von Fluoreszenzbildern in Intervallen die Fluoreszenzproben vor dem Ausbleichen schützen. PC-gesteuerte Systeme sollten außerdem Softwareverfahren zur Aufnahme von Mehrfachfluoreszenz, zur Analyse von Partikelbewegung und zur Analyse von pH und Ionenkonzentrationen (ratio imaging) beinhalten. Auf der Ebene der Bildarstellung sollte das System die Wiedergabe von gespeicherten Videosequenzen in Echtzeit und in Zeitraffung ermöglichen. Zahlreiche Bildverarbeitungspakete werden als „public domain software“ im Internet kostenlos angeboten. das umfangreichste Paket ist das vom National Institute of Health entwickelte NIH-Image, aber es gibt eine Vielzahl weiterer, die von Ladic [11] zusammengestellt wurden.

### 6. Speicherung und Präsentation von Bilddaten

Mikroskopbilder, die erst durch Video-Bildverarbeitung erzeugt und verbessert werden müssen, können nicht direkt am Mikroskop fotografiert werden. Es werden deshalb Ver-

fahren angeboten um videoverstärkte Bilder und Bildsequenzen aufzuzeichnen, sie zu archivieren und zu editieren und um Einzelbilder und Bildsequenzen für größere Betrachtergruppen aufzubereiten.

Traditionell erfolgte die Präsentation videomikroskopischer Daten mit analogen Verfahren, entweder durch Photographie vom Monitor, der Erstellung eines 16mm Films oder dem Abspielen des Videobandes auf einem Monitor. Letzteres ist nur für kleine Gruppen geeignet und das Erstellen von Filmen ist mit hohen Kosten verbunden. Durch die Weiterentwicklung der digitalen Technologien lassen sich nun auch die Aufzeichnung, Archivierung, Editierung und Präsentation von Videodaten mit rein digitalen Techniken durchführen.

#### 6.1 Analoge Aufzeichnung: Videorekorder

Zur Aufzeichnung und Speicherung von mikroskopischen Bildsequenzen sind Videorekorder noch unumgänglich. Die enormen Datenmengen können bequem auf einem Ein- oder Zwei-Stundenband aufgezeichnet werden mit der Möglichkeit die Daten sofort zu überprüfen und sie weiterzubearbeiten. Da es mehrere Videobandformate gibt, sollten bei der Auswahl der geeigneten Videorekorders sorgsam die Vor- und Nachteile des jeweiligen Systems abwogen werden. In der Mikroskopie wird heute vor allem das Super-VHS (S-VHS) System eingesetzt.

#### 6.2 Digitale Speichermedien - ein Ausblick

Es ist anzunehmen, daß in Zukunft die analogen Videorekorder ganz von digitalen Speichermedien verdrängt werden. Um digitale Speichermedien aber als ernsthafte Alternative zu Videobändern anzusehen, sollte man bedenken, daß ein Zwei-Stunden-Videoband in digitaler Form etwa 4 GByte an Speicher benötigt. Die verschiedenen digitalen Speichermedien sind:

**Festplatte und RAM:** Die heutigen PCs sind in der Regel mit 64-128 MByte RAM und einer 5-10 GByte Festplatte ausgestattet, damit eignen sie sich bestens zur Zwischenlagerung von Bildern und kurzen Videosequenzen für eine spätere Archivierung auf langsameren Massenspeichern wie CD-ROM und DVD-ROM.

**Digitale VHS (D-VHS) Bänder:** Die digitalen Videobänder sind in ihrer Aufzeichnungsqualität mit den S-VHS-Bändern vergleichbar und können auch wie diese gehandhabt werden. Die D-VHS Bänder haben zusätzlich den großen Vorteil, daß beim Kopieren Qualitätsverluste vermieden werden. Bisher bieten nur wenige Hersteller diese Systeme an.

**CD-ROM:** Die beschreibbaren CD-ROMs mit 650 MByte eignen sich gut zur Archivierung von Bilddaten, da sie einige tausend Bilder in komprimierter Form aufnehmen können. Schwarzweißbilder sind üblicherweise 0,4 MByte groß und Farbbilder meist über 1 MByte. Zur Speicherung können die Daten komprimiert werden, wobei meistens das jpg-Format verwendet wird. Zur Speicherung von

Videofilmen sind CD-ROMs ungeeignet, allenfalls für kurze Demo-Videoclips.

**DVD (digital video device):** Die DVD-ROM Disketten sind die neuesten Massenspeichermedien. Durch die Einführung von DVD-Schreibern können diese Medien zur Speicherung von Video-Rohdaten und von Demonstrationssequenzen benutzt werden. Der Einsatz dieses neuen Mediums als primäres Aufzeichnungsmedium wird von der Verfügbarkeit einer Technologie abhängen, die es erlaubt, die Videodaten in Echtzeit aufzuzeichnen.

### 6.3 Das Ausdrucken digitaler Bilder

Mit Hilfe einer Kleinbildcamera können Videobilder direkt vom Monitor abphotographiert werden. Inzwischen ist jedoch die digitale Bildverarbeitung die Methode der Wahl. Um Einzelbilder aus einer Videosequenz zu erhalten werden die entsprechenden Bilder über einen Frame Grabber in einen PC eingelesen und dort mit der entsprechenden Bildverarbeitungssoftware für den Druck aufgearbeitet. Die Hardware und Software, die hierfür benutzt werden kann ist so vielfältig, daß im Folgenden nur kurz auf die verschiedenen Typen von Hardware eingegangen werden kann.

**Frame-Grabber-Karten:** Mit einer entsprechenden Frame-Grabber-Karte für den wissenschaftlichen Einsatz lassen sich nicht nur „high end“-CCDs mit einer Auflösung von 640x480 (768x512 für CCIR) Pixel steuern, diese Karten können auch dazu benutzt werden, Videobilder von einem S-VHS Band oder von einer Camera in einen Computer einzulesen. Sobald das Videobild eingelesen ist, kann es mit einer entsprechender Bildverarbeitungssoftware wie PhotoShop oder Paint Shop Pro nachbearbeitet werden. Um jedoch maximale Information in Helligkeit und Kontrast zu erhalten, bedarf es einer genauen Einstellung des Analog-Digital-Wandlers. Die Optimierung erfolgt durch die Wahl der entsprechenden „look up table“ (LUT). Zusätzlich können noch digitale Filter angelegt werden, um das Hintergrundrauschen zu minimieren und das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern.

**Video-Printer:** Video-Printer besitzen eine eingebaute Frame-Grabber-Karte und stellen somit die einfachste Methode dar, Ausdrücke von einem Videosignal zu erhalten. Das Videosignal sollte stets über den Video-Printer zu einem Kontrollmonitor geführt werden. Die Qualität dieser Bilder ist zur Dokumentation von Experimenten ausreichend.

**Druck digitaler Bilder in photographischer Qualität:** Zum Druck von Bildern in photographischer Qualität gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten wie den Laserfarbdrucker, den Farbsublimationsdrucker und den Inkjet-Drucker. Die Wahl des geeigneten Druckers wird jeweils von den Verbrauchskosten und dem Druckaufkommen abhängig sein. So sind Sublimationsdrucker und Laserdrucker eher teuer in der Anschaffung aber kostengünstig im Verbrauch, während der Inkjet-Drucker günstiger in der Anschaffung aber teurer im Verbrauch ist.

**Digitale Diabelichter:** Mehrere Hersteller bieten inzwischen Diabelichter an, die das Kop-

ieren eines digitalisierten Videobildes direkt auf einen Diafilm erlauben. Das Belichten des Diafilms erfolgt in diesen Geräten ähnlich wie beim normalen Papierausdruck. Obwohl die Diabelichter für Farbfilme optimiert sind, können sie auch zur Belichtung von S/W-Negativen und S/W-Diafilmen herangezogen werden.

#### 6.4. Erstellung und Präsentation von

##### Videobildsequenzen

Zur Vorführung von Videodaten ist es in der Regel notwendig kurze Videosequenzen (video clips) zusammenzustellen und zu editieren. Die Art der Geräte, die zum Vorführen von Videosequenzen nötig sind, ist von der Größe des Auditoriums abhängig. Analog- und Digitalprojektoren ermöglichen die Projektion von Videodaten unabhängig von ihrer Quelle, entweder als Analogsignal (Videoband) oder Digitalsignal (Computer-Festplatte, CD-ROM oder Internet). Weitere nützliche Hinweise über das Zusammenstellen von Videosequenzen können in einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel gefunden werden [12].

##### Literatur

- [1] **Jäger, R.** (1999) Das kleine Einmaleins der Geldokumentation. *BIOforum No. 1-2, 21-24*
- [2] **Shotton, D.M.** (ed.) (1993) *Electronic Light Microscopy: The Principles and Practice of Video-Enhanced Contrast, Digital Intensified Fluorescence and Confocal Laser Scanning Microscopy.* Wiley-Liss, New York, 355p
- [3] **Inoué, S., Spring, K.R.** (1997) *Video Microscopy: The Fundamentals.* Plenum Press, New York, 2nd. ed., 741 p.
- [4] **Sluder, G. Wolf, D. E.** (ed.) (1998). *Video Microscopy. Methods in Cell Biology, Academic Press, New York, Vol 56, 320p*
- [5] **Weiss, D.G., Maile, W., Wick, R.A., Steffen, W.** (1999) *Video Microscopy.* (Chapter 4) In: *Light Microscopy in Biology. - A Practical Approach, A.J. Lacey (ed.) Oxford University Press, Oxford, pp. 73-149 (in press)*
- [6] **Weiss D.G.** (1998) *Video-enhanced contrast microscopy.* In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook (J.E. Celis, ed.), Academic Press, New York 2nd ed., Vol. 3, 99-108*
- [7] **Russ, J. C.** (1994). *The Image Processing Handbook.* CRC Press, London, 2<sup>nd</sup> ed., 674p
- [8] **Anonymous** (1995) *A guide to selecting electronic cameras for light microscope-based imaging.* *American Laboratory, April 1995, 25-40*
- [9] **Anonymous** (1998) *Faster, smaller, cheaper.* *Image Processing, October Issue, 34-42*
- [10] **Oshiro, M.,** (1998) *Cooled CCD versus intensified cameras for low-light video – Application and relative advantages.* In: *Video Microscopy. Methods in Cell Biology, Academic Press, New York, Vol 56, 45-62*
- [11] **Ladic, L.A.** (1998) *The use of internet graphics software for the processing and display of digital microscopic data.* In *Cell Biology: A Laboratory Handbook (ed. J.E. Celis), Academic Press, New York, 2<sup>nd</sup> ed., Vol. 3, 189-205.*
- [12] **Waterman-Storer, C.M., Shaw, S.L., and Salmon, E.D.** (1997). *Production and*

*presentation of digital movies.* *Trends Cell Biol., 7, 503-506*

##### Korrespondenzadresse

*Dr. Walter Steffen*

*Prof. Dieter G. Weiss*

Institut für Zellphysiologie und Biosystemtechnik und Zentrum für lichtmikroskopische Meß- und Beobachtungsverfahren  
 Fachbereich Biologie, Universität Rostock  
 Universitätsplatz 2  
 18051 Rostock