

Universität Leipzig
Fakultät für Mathematik und Informatik
Institut für Informatik

**Auswertung von Gefäßstrukturen in
Laserscanning-Volumendaten**

Diplomarbeit

betreut von PD Dr. Frithjof Kruggel und Dr. Jens-Peer Kuska

Lars Heinz-Werner Metz	Karsten Winter
Matrikelnummer: 8158640	Matrikelnummer: 8157458
geboren am 17.08.1976	geboren am 02.02.1978
Studiengang Diplominformatik	Studiengang Diplominformatik

Leipzig, 20. August 2004

Kurzzusammenfassung

Inhalt der vorliegenden Arbeit ist die Vorstellung einer bildanalytischen Methodik zur räumlich bezogenen Quantifizierung morphologischer und topologischer Reifungsparameter von in vitro gewachsenem Fettgewebe. Diese Reifungsparameter sollen später Rückschlüsse auf die am Gewebewachstum beteiligten Wachstumsparameter im Hinblick auf deren Optimierung erlauben und somit als Grundlage einer qualitativen Analyse des Gewebes für die plastisch rekonstruktive Chirurgie dienen. Die Berechnung der einzelnen Reifungsparameter erfolgt im Rahmen einer Bildverarbeitungskette. Diese umfasst die Glättung und Ausheilung der aus dem Gewebe gewonnenen Volumendatensätze mittels eines gekoppelten anisotropen nichtlinearen Reaktionsdiffusionssystems, die Ermittlung des Bedeckungsgrades der kapillaren Strukturen mit Muskelzellen, die Berechnung der Kompaktheit, eine Skelettierung der Volumendatensätze und die Vektorisierung des entstandenen Skelettes. Anhand von Beispielen wird die Wirkungsweise sowohl der einzelnen Bildverarbeitungsschritte als auch der gesamten Bildverarbeitungskette dargestellt. Die Oberfläche der Blutgefäße des Gewebes und deren Skelett werden zum besseren Verständnis der extrahierten Reifungsparameter visualisiert. Eine statistische Auswertung der gewonnenen Reifungsparameter soll Informationen zur Verbesserung der Oxygenierungs- und Ernährungssituation des in vitro gewachsenen Gewebes liefern. Abschließend werden Ergebnisse der Analyse von Volumendatensätzen und des Vergleichs zur bisherigen Messmethode vorgestellt und diskutiert.

Danksagung

Wir möchten uns ganz herzlich bei Herrn Dr. Jens-Peer Kuska für die immer gewährte, geduldige und freundliche Unterstützung der Arbeit durch häufige Diskussion und viele Anregungen bedanken.

Darüber hinaus möchten wir uns bei Herrn PD Dr. Frithjof Kruggel für wertvolle Hinweise und anregende Gespräche bedanken.

Weiterhin gilt unser Dank Herrn PD Dr. Dr. Bernd Frerich, welcher uns mit umfangreichem Datenmaterial versorgte und ein steter Ansprechpartner war.

Auch sind wir Frau Sabine Hirsch vom Institut für Zoologie für ihre Unterstützung beim Umgang mit dem Laser Scanning Mikroskop sehr zu Dank verbunden.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	11
2. Gewebewachstum	15
3. Merkmalsextraktion	18
3.1. Bilderzeugung	19
3.1.1. Aufbau und Funktionsweise eines CLSM	19
3.1.2. Einflussfaktoren	21
3.1.3. Erzeugung der optisch erfassten Schichtbilder	22
3.1.4. Resultate	23
3.2. Vorverarbeitung der Datensätze	24
3.2.1. Dekonvolution des Bildmaterials	24
3.2.2. Zusammenführen der Schichtbilder	26
3.2.3. Glättung und Ausheilung der Volumendatensätze	26
3.2.4. Resultate	29
3.3. Bedeckungsgrad	29
3.3.1. Resultate	32
3.4. Schwellwert	32
3.4.1. Grundlagen	33
3.4.2. Binarisierung des Volumens	35
3.4.3. Resultate	39
3.5. Kompaktheit der Komponenten	39
3.5.1. Grundlagen	40
3.5.2. Ähnliche Algorithmen	42
3.5.3. Berechnung der Kompaktheit	42
3.5.4. Resultate	48

3.6. Skelettierung	48
3.6.1. Grundlagen	52
3.6.2. Skelettierungsalgorithmen	54
3.6.3. TopoSkel	59
3.6.4. Resultate	64
3.7. Vektorisierung	64
3.7.1. Algorithmus	65
3.7.2. Resultate	67
3.8. Zusammenfassung der Bildverarbeitungskette	68
4. Visualisierung	70
5. Bewertung der Reifungsparameter	73
6. Ergebnisse	76
6.1. Auswertung der aktuellen Bildserien	77
6.1.1. Vergleich Anfangs-, Kontroll- und Perfusionsgruppe	80
6.2. Vergleich zur interaktiven Ausmessung	84
7. Schlussfolgerung und Ausblick	92
8. Literaturverzeichnis	94
A. Implementationen	98
A.1. Das MathLink-Programm Bedeckungsgrad	98
A.1.1. Programm Benutzung	98
A.1.2. Programmausgabe	99
A.2. Das MathLink-Programm TopoSkel	99
A.2.1. Programm Benutzung	100
A.2.2. Programmausgabe	100
B. Datensätze	103

Abbildungsverzeichnis

2.1. Ablaufplan des Gewebewachstums	16
3.1. Strahlengang in einem CLSM	20
3.2. Im CLSM erzeugte Schichtbilder	23
3.3. Dekonvolution der Schichtbilder	25
3.4. Vergleich zwischen isotroper und anisotroper nichtlinearer Diffusion	28
3.5. Dekonvolution und Glättung	29
3.6. Vorverarbeitungsschritte der Schichtbilder	30
3.7. Bedeckungsgrad von Endothel- und Muskeldatensatz	32
3.8. Mit festem Schwellwert binarisierter Endothelzelldatensatz	33
3.9. Die Standardnormalverteilung und ihre Kumulative Verteilungsfunktion	34
3.10. Fehler der rationalen Approximation	35
3.11. Transformation von Grauwerten	36
3.12. Vergleich von festem und adaptivem Schwellwert	38
3.13. Der binarisierte Endothelzelldatensatz	39
3.14. Die Nachbarschaften in 3D	41
3.15. Dekomposition eines Würfels in fünf Tetraeder	43
3.16. Gerade und ungerade Tetraederkonfiguration	44
3.17. Mögliche Konfigurationen von Würfeln und Tetraedern	46
3.18. Einige Objekte und ihre Kompaktheit	47
3.19. Die Oberfläche des Endothelzelldatensatzes	48
3.20. Oberfläche, Medialfläche und Medialachse	49
3.21. Zweidimensionale Objekte mit einbeschriebenem Skelett	49
3.22. Non-Simple Points und Simple Point	52
3.23. Die Richtungen bei der Skelettierung	52
3.24. Das Linienendvoxel	53

Abbildungsverzeichnis

3.25. Aus Simple Points bestehendes Objekt	54
3.26. Einige Körper und deren mit TopoSkel erzeugtes Skelett	62
3.27. Isotrope und anisotrope Skelettierung	63
3.28. Skelett des Endothel-datensatzes	64
3.29. Gute und schlechte Vektorisierung in 2D	65
3.30. Vektorisierung in 2D	66
3.31. Oberfläche und vektorisiertes Skelett des Endothel-datensatzes	67
3.32. Schema der Bildverarbeitungskette	69
4.1. Simplifizierung von Linienzügen	71
4.2. Screenshot MathGL3d	72
6.1. Vergleich von Anfangs-, Kontroll- und Perfusionsgruppe	83
6.2. Ausgangsqualität des Bildmaterials	85
6.3. Originalbild und TV-Filterung	86
6.4. Maskierung der Maximumprojektion	87
6.5. Maximumprojektion, Oberfläche und Skelett der Kapillaren	88
6.6. Vorverarbeitung des Bildmaterials und automatische Ausmessung	88
6.7. Lineare Regression der interaktiv und automatisch ermittelten Kapillarlängen	90
B.1. Anfangsserie 01 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	104
B.2. Anfangsserie 02 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	105
B.3. Anfangsserie 03 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	106
B.4. Anfangsserie 05 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	107
B.5. Anfangsserie 06 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	108
B.6. Kontrollserie 01 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	109
B.7. Kontrollserie 02 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	110
B.8. Kontrollserie 03 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	111
B.9. Kontrollserie 04 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	112
B.10. Kontrollserie 05 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	113
B.11. Kontrollserie 06 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	114
B.12. Perfusionsserie 01 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	115
B.13. Perfusionsserie 02 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	116
B.14. Perfusionsserie 03 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	117
B.15. Perfusionsserie 04 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	118
B.16. Perfusionsserie 05 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett	119

Abbildungsverzeichnis

B.17. Perfusionsserie 06 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett . . .	120
B.18. Perfusionsserie 07 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett . . .	121
B.19. Perfusionsserie 08 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett . . .	122
B.20. Perfusionsserie 09 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett . . .	123
B.21. Perfusionsserie 10 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett . . .	124
B.22. Perfusionsserie 11 - Maximumprojektionen, Oberfläche und Skelett . . .	125

Tabellenverzeichnis

6.1. Reifungsparameter I	77
6.2. Reifungsparameter II	79
6.3. Vergleich der drei Wachstumsgruppen	81
6.4. Interaktiv und automatisch gemessene Kapillarlängen	89
A.1. Parameter des MathLink-Programmes Bedeckungsgrad	99
A.2. Parameter des MathLink-Programmes TopoSkel	101

Abkürzungsverzeichnis

CCD - Charge-Coupled Device
CD31 - Cell Adhesion Molecule PECAM-1
CLSM - Confocal Laserscanning Microscope
FITC - Fluorescein Isothiocyanate
HUVE - Humane Umbilikale Venöse Endothelzellen
PECAM-1 - Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
Pixel - Picture Element
PSF - Point Spread Function
TRITC - Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate
TV-Filter - Total Variation Filter
UEA-I - Ulex Europaeus Agglutinin I
Voxel - Volume Element

nm - Nanometer
 μm - Mikrometer
mm - Millimeter
cm - Zentimeter

Kapitel 1.

Einleitung

Im Bereich der plastisch-rekonstruktiven Chirurgie erhält das Tissue Engineering von Weichgeweben (Fettgewebe) eine immer größere Bedeutung. Hierbei steht das Problem der Ernährung und Oxygenation größerer Gewebsformationen im Mittelpunkt des Interesses, da die Versorgung der Zellen im Gewebe mittels Diffusion sowohl in vivo als auch in vitro 150 μm Gewebedicke nicht überschreiten kann [FKLM 2000]. Die Etablierung eines Gefäßnetzes, das die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen übernehmen kann, ist ein möglicher Lösungsansatz für dieses Problem.

Den Ausgangspunkt dieser Arbeit bildet ein Gewebevolumen, in welchem die Ausbildung eines kapillaren Netzwerkes untersucht werden soll. Ziel ist es, eine automatisierte bildanalytische Methodik zur morphologisch und topologisch orientierten Analyse von Reifungsparametern bezüglich Ausbildung und Stabilisierung des kapillaren Netzwerkes zu erarbeiten. Zur Zeit fehlt eine solche quantitative Bewertung eines Gefäßsystems im Hinblick auf die Optimierung der das Wachstum beeinflussenden Parameter. Wachstumsparameter sind zum Beispiel Temperatur, Versorgung mit Nährstoffen, Oxygenisierung und mechanische Einwirkungen auf das Gewebe.

Bisherige Arbeiten haben die automatisiert ablaufende Extraktion einiger weniger Reifungsparameter bzw. die interaktive Auswertung der einzelnen Schichten eines Gewebevolumens im Hinblick auf die Gefäßlänge zum Inhalt. Als Beispiel für eine solche, der Fachwelt bereits vorgestellte, automatisierte Analyse kapillarer Strukturen soll im Folgenden der Artikel „A Technique for Quantitative Three-Dimensional Analysis of Microvascular Structure“ aus dem Jahr 2002 dienen [BKJMRP 2002].

Die Arbeit dieser Forschergruppe basierte auf histologischen Schnitten von in die Muskulatur lebender Ratten eingesetzten Fibrinimplantaten. Dabei untersuchte man das Wachstum von Blutgefäßen vom Muskel aus in diese Implantate hinein. Nach sieben Tagen

Wachstum wurden $6\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte aus gefrorenen Gewebeproben angefertigt, mit dem endothelzellspezifischen Marker CD31 markiert und unter Verwendung einer CCD-Kamera (digitale Aufzeichnung mittels in einem zweidimensionalen Feld angeordneter optischer Sensoren, im Ganzen auch Array-Sensor genannt) bei einer Auflösung von $0.6\ \mu\text{m}^2$ Objektfläche pro Pixel fotografiert. Das betrachtete Gewebevolumen setzte sich aus insgesamt 50 Schichten zusammen und maß $764\ \mu\text{m} \times 576\ \mu\text{m} \times 300\ \mu\text{m}$. Danach erfolgte die Registrierung und die damit einhergehende Restauration der einzelnen Schichtbilder und die Erzeugung der Volumendatensätze. Aus diesen wurden Reifungsparameter wie Gewundenheit, Durchmesser und Länge der Kapillaren, sowie die Verhältnisse von mit Endothelzellen belegtem Volumen bzw. leerem Volumen zum Gesamtvolumen berechnet. Ein Volumenrendering bildete den Abschluss der Analyse der Datensätze, die das Ausgangsmaterial für weitere Untersuchungen, im Paper wird eine fraktale Analyse erwähnt, darstellen können. Dies war jedoch nicht mehr Gegenstand der Publikation dieser Forschergruppe.

Die vorliegende Arbeit verfolgt eine etwas andere Herangehensweise an die Analyse eines kapillaren Netzwerkes in einem Gewebevolumen. Zunächst wurden aus dem in vitro gewachsenen Gewebe, nach einer Behandlung mit zelltypspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen (auch als Fluorophore bezeichnet), in einem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Confocal Laserscanning Microscope, im Folgenden kurz CLSM genannt) Schichtbilder erzeugt. Diese zerstörungsfreie optische Erfassung von Schichtbildern macht die Herstellung histologischer Schnittpräparate, welche anschließend mit einer CCD-Kamera fotografiert werden, und die nachfolgende Registrierung der einzelnen Schichtbilder überflüssig. Bei der Anfertigung von histologischen Schnittpräparaten können Gewebeteile verschoben, verändert oder gar zerstört werden, wie es zum Beispiel durch ein stumpfes Schneidwerkzeug möglich ist. Bei der Registrierung der einzelnen Schnittbilder müssen die so entstandenen nichtlinearen Veränderungen des Gewebes rückgängig gemacht werden. Die Restauration von Schichtbildern mit beschädigten oder zerstörten Gewebeteilen durch Interpolation bringt darüber hinaus Gewebszellen in die Schichtbilder, die sich vor dem Schneiden wahrscheinlich, jedoch nicht mit absoluter Sicherheit, an den jeweiligen Stellen im Gewebe befanden.

Desweiteren wurde nicht nur ein Volumendatensatz für die Endothelzellen (Zellen, aus denen das Gefäßnetzwerk besteht), sondern auch einer für die Muskelzellen (Zellen, die die Kapillaren umschließen) erzeugt. Diese beiden Datensätze mit unterschiedlichen Zelltypen ein und desselben Gewebevolumens erlauben die Analyse der Stabilisierung des kapillaren Netzwerkes. Nachdem beide Datensätze generiert wurden, erfolgten die Deconvolution der Schichtbilder [Ric 1972]/[Luc 1974] sowie die Glättung und Aushei-

lung der Datensätze mithilfe eines gekoppelten anisotropen nichtlinearen Reaktionsdiffusionssystems [KF 2002]. Danach wurde der Bedeckungsgrad des Gefäßnetzwerkes mit Muskelzellen als erster Reifungsparameter ermittelt [KF 2002]. Die Analyse der Ausbildung des kapillaren Netzwerkes fand anschließend im Volumendatensatz der Endothelzellen statt und bestand in der Berechnung mehrerer aussagekräftiger Reifungsparameter in zwei Schritten. Als erstes erfolgte die Berechnung der Kompaktheit der einzelnen Bestandteile des Gefäßnetzes mithilfe des Marching Tetrahedron Algorithmus [GH 1994]. Eine Skelettierung des Datensatzes mittels des eigens dafür entwickelten, isotrop als auch anisotrop arbeitenden Skelettierungsalgorithmus **TopoSkel**, sowie die Vektorisierung des entstandenen Skelettes, bildeten die Voraussetzung für die Extraktion weiterer Reifungsparameter. Dies waren die Länge der einzelnen Kapillaren und die Gesamtgefäßlänge im betrachteten Gewebevolumen, die Art und Anzahl der Kreuzungen im Hinblick auf den Vernetzungsgrad der Kapillaren und die Anzahl der Endpunkte der Kapillaren.

Die hier vorgestellte bildanalytische Methodik sowie eine Reihe weiterer Algorithmen wurden in C++ implementiert und können als MathLink-Programm in Mathematica eingebunden werden. Der Grund für die Implementation als MathLink-Programme lag einerseits in der einfachen und komfortablen Befehlssprache Mathematicas mit welcher die C++ Programme angesprochen werden können. Desweiteren sind für unsere Zwecke in C++ geschriebene Programme im Hinblick auf die benötigte Rechenzeit wesentlich schneller als ihre in Mathematica implementierten Gegenstücke.

Da sich die Arbeiten zum in vitro Wachstum von implantierbaren Gewebeformationen noch im Anfangsstadium befinden, beinhaltet das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Gewebe noch kein vollständig ausgebildetes Gefäßnetzwerk - es handelt sich hierbei vielmehr um ein Geflecht von Endothelzellen ohne inneres Lumen. Dennoch sei dieses Endothelzellengeflecht, gerade auch im Hinblick auf die weiteren Forschungen zum Gewebewachstum, als „Kapillaren“ bezeichnet. Die hier vorgestellte bildanalytische Methodik lässt sich aber sowohl auf die derzeit verfügbaren Daten, als auch auf ein vollständig ausgebildetes Gefäßnetzwerk anwenden.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich wie folgt: Im Anschluss an die Einleitung wird zunächst das Gewebewachstum thematisiert. Danach erfolgt die Vorstellung einer Bildverarbeitungskette, die der Extraktion der oben genannten Reifungsparameter zugrunde liegt. Im Sinne eines „Roten Fadens“ wird anhand des Datensatzes Perfusionsserie 09 die Wirkungsweise jedes einzelnen Bildverarbeitungskettengliedes verdeutlicht. Die Visualisierung der Volumendatensätze und der aus ihnen extrahierten grafischen Daten soll zum besseren Verständnis beitragen. An die Bewertung der einzelnen Reifungsparameter schließt sich der Ergebnisteil an. Die Arbeit wird inhaltlich mit einer zusammenfassenden

den Schlussfolgerung abgeschlossen. Im Anhang befinden sich die Übersicht über die Bedienung der Implementationen und eine detaillierte Auswertung aller betrachteten Gewebevolumen.

Kapitel 2.

Gewebewachstum

Die zu analysierenden Gewebsäquivalente bestehen aus humanen Fettgewebsstromazellen, humanen umbilikalen venösen Endothelzellen (HUVE), Muskelzellen und einem Trägermaterial aus Gelatineschwämmchen [Züc 2004].

Die humanen Fettgewebsstromazellen werden aus humanem Fettgewebe gewonnen. Es handelt sich hierbei um überschüssige Fettgewebestücke, die bei Routineoperationen entnommen wurden und deren Größe bei durchschnittlich 0.5 cm^3 liegt. Man zerschneidet die Gewebestücke unter sterilen Bedingungen, beendet die Enzymaktivität durch Zugabe eines serumhaltigen Zellkulturmediums, filtriert diese Zellsuspension durch ein $100 \mu\text{m}$ großes Nylonnetz und zentrifugiert den Überstand. Das entstandene Pellet wird anschließend in das serumhaltige Zellkulturmedium resuspendiert und in fibrinbeschichtete Kulturflaschen ausgesät.

Die Muskelzellen differenzieren sich während des gesamten folgenden Wachstumsvorgangs aus den Fettgewebsstromazellen heraus. Letztere haben Stammzellcharakter und können sich unter mechanischem Einfluß zu Muskelzellen entwickeln.

Die Endothelzellen gewinnt man aus Nabelschnüren. Diese werden nach der Entbindung abgeklemmt und die Nabelvene unter sterilen Bedingungen kanüliert. Durch Zugabe von serumhaltigem Zellkulturmedium beendet man die Enzymaktivität und die gewonnene Zellsuspension wird zentrifugiert. Das entstandene Pellet wird anschließend in das serumhaltige Zellkulturmedium resuspendiert und in gelatinebeschichtete Kulturflaschen ausgesät.

Zur Herstellung der Gefäßäquivalente schneidet man die Gelatineschwämmchen zylinderförmig zu und höhlt ihren inneren Teil aus. Die so entstandenen Gelatineröhrchen haben eine Länge von 50 mm, einen Außendurchmesser von 5-8 mm und einen luminalen Innendurchmesser von 1-2 mm. Sie werden sterilisiert und in einem Rotationskulturcon-

tainer platziert, der mit einem Kulturmedium blasenfrei aufgefüllt und auf einer Drehvorrichtung installiert ist. Die Besiedlung der Gelatineröhrchen mit Fettgewebsstromazellen erfolgt nach einer 24-stündigen Anpassungszeit und wird in der anschließenden Kultivierungsperiode von drei bis vier Wochen zwei- bis dreimal im wöchentlichen Intervall wiederholt.

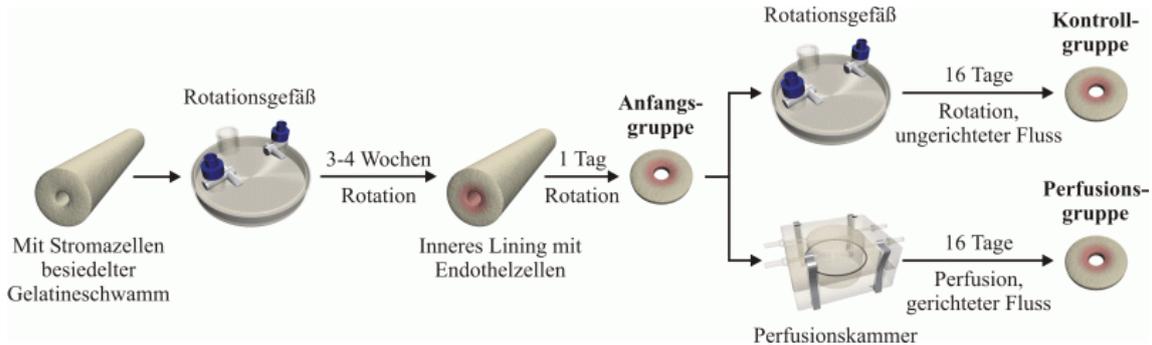


Abbildung 2.1.: Ablaufplan des Gewebewachstums

Die Endothelzellen werden einen Tag vor Beginn der Versuche voneinander abgelöst, zentrifugiert und in dialysiertes und gereinigtes Fibrin eingebettet. Mit dieser Fibrinsuspension, die spontan polymerisiert, sobald sie in das Gelatineröhrchen geträufelt wird, besiedelt man die nunmehr dicht mit Fettgewebsstromazellen bewachsenen Gelatineröhrchen im Sinne eines inneren Linings. Ein im inneren Lumen angebrachter Silikon-Mandrin von 1 mm Durchmesser, der nach sechs Stunden wieder entfernt wird, unterstützt den Vorgang der Besiedlung. Das in dieser Weise geschaffene Gewebeäquivalent platziert man wieder im langsam rotierenden Rotationskulturcontainer. Die langsame Rotation trägt zur besseren Durchmischung von Kulturmedium und Zellaggregat und somit zur verbesserten Ernährung des Gewebeäquivalentes bei - gleichzeitig reduziert sie Scherkräfte auf ein Minimum und unterbindet turbulente Strömung.

Nach einem Tag Wachstum im Rotationskulturcontainer wird eine 1 mm dicke Gewebeprobe für die Präparate der Anfangsgruppe entnommen. Einen Teil des übrigen Gefäßäquivalentes überführt man in die Perfusionskultur (Perfusionsgruppe, gerichtete Dynamik), der Rest verbleibt im Rotationskulturcontainer (Kontrollgruppe, ungerichtete Dynamik).

Die Perfusionskultur wird in einer doppelten Perfusionskammer fixiert und über ein geschlossenes System mit peristaltischer Pumpe mit einem Kulturmedium perfundiert. Im weiteren Verlauf des Wachstums erhöht man kontinuierlich den Puls der Pumpe und die

Perfusionsrate.

Nach 16 Tagen entnimmt man den Gefäßäquivalenten der Perfusions- und Kontrollgruppe Proben. Wie auch schon bei der entnommenen Probe der Anfangsgruppe erfolgt die Untersuchung des entstandenen kapillaren Netzwerkes an drei Stellen des Gefäßäquivalentquerschnittes: an der Oberfläche des Gefäßäquivalentes zum inneren Lumen, im Inneren der Wandung des Gefäßäquivalentes und an der Oberfläche des Gefäßäquivalentes nach außen hin. Die Präparate der Anfangs-, Kontroll- und Perfusionsgruppe bilden die Grundlage für die nun folgende Merkmalsextraktion.

Kapitel 3.

Merkmalsextraktion

Gegenstand dieses Kapitels ist die Extraktion von Merkmalen aus den Volumendatensätzen im Rahmen einer automatisierten Bildverarbeitungskette, die bei der Bilderzeugung beginnt und sich bis hin zur Analyse vektorisierter Volumendatensätze erstreckt. Die extrahierten Merkmale entsprechen hierbei den Reifungsparametern, anhand derer das Gewebevolumen räumlich quantifiziert werden kann. Der Prozess der Merkmalsextraktion entspricht der Extraktion relevanter Informationen, die die wesentlichen Merkmale eines Volumendatensatzes wiedergeben.

So scheinbar einfach Extraktion von Informationen und Verarbeitung derselben beim Menschen ablaufen, so schwierig kann deren technische Realisierung sein. Ein technisches System hat, im Gegensatz zum Menschen, geringe Erkennungsleistung und -geschwindigkeit, vermag jedoch große Leistungen im Hinblick auf eine präzise objektive Messung von Eigenschaften quantitativer Natur zu vollbringen - hier kann das menschliche visuelle Erkennungssystem lediglich ungenaue Informationen liefern. Bevor nun im Einzelnen auf die zu extrahierenden Reifungsparameter und die für sie zuständigen Glieder der Bildverarbeitungskette eingegangen wird, sei diese kurz erläutert.

An erster Stelle der Kette steht die Bilderzeugung mittels eines CLSM. Die optisch erfassten Schichtbilder werden für die Färbung ein und desselben Gewebevolumens mit einem muskelzellspezifischen, sowie einem endothelzellspezifischen Fluoreszenzfarbstoff erzeugt, entfaltet und danach jeweils in einen Volumendatensatz für Muskel- und Endothelzellen umgewandelt. Beide Volumendatensätze werden mittels eines gekoppelten anisotropen nichtlinearen Reaktionsdiffusionssystems [KF 2002] geglättet und damit einhergehend die in ihnen enthaltenen Strukturen ausgeheilt. Danach erfolgt die Ermittlung des maximalen Bedeckungsgrades und des mit ihm verbundenen optimalen Schwellwertes für die Binarisierung des Endotheldatensatzes [KF 2002]. Alternativ kann, um einen besser

zu skelettierenden Binärdatensatz zu erhalten, dieser optimale Schwellwert zuvor in einen adaptiven Schwellwert umgewandelt werden. Nachdem die Binarisierung durchgeführt wurde, erfolgt die Berechnung der Kompaktheit und nachfolgend eine Skelettierung der kapillaren Strukturen. Die Vektorisierung des entstandenen Skelettes ermöglicht schließlich eine Untersuchung der Morphologie und Topologie der kapillaren Strukturen. Die hier vorgestellte Bildverarbeitungskette entspricht einer sogenannten Bottom-Up Bildanalyse. Grundlage bildet die Bilderzeugung, welche eine Abbildung des Gewebes erzeugt. Darauf aufbauend findet die Vorverarbeitung statt, die das Bildmaterial angemessen aufbereitet. Die Erkennung von Merkmalen aus den verbesserten Bildern stellt den Abschluss der Analyse dar.

3.1. Bilderzeugung

In vielen anderen thematisch verwandten Arbeiten (zum Beispiel [BKJMRP 2002]) ist die Anfertigung von Gewebeschnitten aus entweder tiefgefrorenen oder in Paraffin gegossenen Gewebeproben üblich. Das Schneiden dieser Gewebeproben führt allerdings zu einer Beschädigung und Verschiebung der im Gewebe liegenden Zellverbände und somit zu fehlerhaften Schichtbildern, welche registriert und mittels Interpolation restauriert werden müssen. Um diese zusätzlichen Vorverarbeitungsschritte zu umgehen und qualitativ höherwertige Schichtbilder zu erhalten, bedient man sich der Möglichkeit eines CLSM, Schichtbilder sehr dünner Gewebeschichten aus vergleichsweise dicken Gewebeproben anzufertigen und dabei die Zellstrukturen innerhalb des Gewebes nicht zu beschädigen. Hierbei nutzt man die Fluoreszenzeigenschaften von Antikörpern bestimmter Zelltypen, so genannten spezifischen Markern, um genauere Bildinformationen über die Position dieser Zelltypen in der optischen Schnittebene zu erhalten [WGGH 2000].

3.1.1. Aufbau und Funktionsweise eines CLSM

Der Vorgang der Bilderzeugung entspricht einer Transformation Objekt-zu-Bild. Während diese in einem konventionellen Lichtmikroskop parallel erfolgt, läuft sie in einem CLSM seriell ab. Die Messung der physikalischen Wechselwirkung (in diesem Fall die Fluoreszenz) erfolgt punktweise an der aktuell bestrahlten Objektstelle. Der Laserstrahl wird über den abzubildeten Objektbereich bewegt und rastert die Probe ab. Ein auf diese

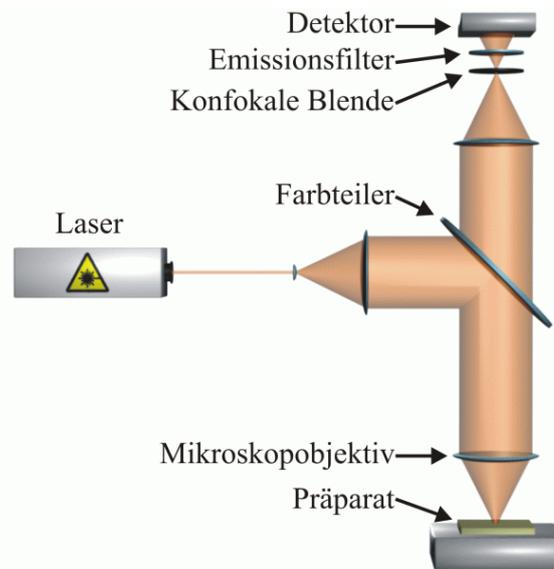


Abbildung 3.1.: Strahlengang in einem CLSM

Weise erzeugtes Bild ist somit das Ergebnis vieler lokaler Detektionen, der vom Präparat emittierten Fluoreszenzstrahlung. Aus diesem Grunde werden CLSMs auch Punktscanner genannt. Der wesentliche Unterschied zwischen einem konventionellen Mikroskop und einem CLSM besteht im Vorhandensein einer konfokalen Blende bei letzterem. Diese Blende ist in einer zur Zwischenbildebene, und somit auch zur Objektebene des Mikroskops, konjugierten Ebene angeordnet. Den Detektor erreicht nur Licht, welches die variable konfokale Blende passiert.

Der das Präparat abtasternde Laserstrahl ist beugungsbegrenzt fokussiert und entspricht einer punktförmigen Beleuchtung des Objektes. Weiterhin werden Beleuchtungs- und Beobachtungspunkt ineinander abgebildet - eine Folge der Anordnung der Bauteile in konjugierten Ebenen. Solch ein Strahlengang wird auch als konfokal bezeichnet, er ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Die Menge des Lichtes, das den Detektor von Objektpunkten außerhalb der Fokusebene erreicht, wird vom Durchmesser der konfokalen Blende bestimmt. Ausgeblendete Objektbereiche sind im aufgenommenen Schichtbild unsichtbar. Die konfokale Blende ist darüber hinaus auch Streulicht unterdrückend - ein Merkmal, das zur Kontraststeigerung der erzeugten Bilder beiträgt.

Im Folgenden sei kurz der Ablauf beim Erzeugen eines optisch erfassten Schichtbildes geschildert: Ein Laserstrahl wird mittels eines Mikroskopobjektives auf das Präparat fokussiert. Er regt die dort vorhandenen Fluorophore zum Emittieren von Fluoreszenzstrahlung an. Diese wird beim Passieren des Mikroskopobjektives gesammelt, durchläuft Farbteiler, konfokale Blende und Emissionsfilter und erreicht schließlich den Detektor, einen Photomultiplier. Die konfokale Blende lässt Licht von außerhalb der Fokusebene defokussiert auftreffen und der Emissionsfilter ist nur für einen speziellen Wellenlängenbereich, nämlich den der Fluoreszenzstrahlung, durchlässig. Für verschiedene Fluorophore werden also verschiedene Filter benötigt.

Eine geringfügige Verlagerung der Fokusebene ermöglicht die Erzeugung eines Schichtbildes aus darunter- oder darüber liegenden Schichten des Präparates. Mehrere räumlich aufeinander abfolgende Bilder repräsentieren die einzelnen Schichten eines Präparates und können zu einem Volumendatensatz zusammengesetzt werden.

3.1.2. Einflussfaktoren

Beim Erzeugen optisch erfasster Schichtbilder mittels eines CLSM wirken viele Faktoren auf die Abbildungsqualität ein; nicht nur die Restfehler der Optik des Mikroskopobjektives beeinflussen das Resultat.

Basierend auf den optischen Eigenschaften eines CLSM wird eine punktförmige Lichtquelle nicht als Punkt, sondern vielmehr als ein unscharfes, dreidimensionales Gebilde mit einem zentralen, ellipsenförmigen Maximum abgebildet. Diese Helligkeitsverteilung wird auch als Point Spread Function (PSF) bezeichnet und spiegelt das reale Abbild einer theoretisch punktförmigen Lichtquelle wieder [WGGH 2000]. Die PSF eines CLSM ist abhängig von diversen mikroskopischen Parametern (Typ, Fabrikat, Justierung, Objektiv, numerische Apertur, Brechungsindex des Immersionsmediums usw.). Ist sie bekannt, kann man einigermaßen genau von einem durch das CLSM erzeugte Schichtbild auf die tatsächliche Verteilung der Fluorophore im Gewebe rückschließen.

Eine Verringerung des Blendendurchmessers hat einen Intensitätsverlust am Detektor zur Folge, schließlich erreichen diesen immer weniger Photonen. Desweiteren tragen auch die nicht immer gleichmäßige Ausleuchtung des Objektes, sowie Abschattungseffekte aufgrund von über der Objektebene liegenden Zellstrukturen zu Abbildungsfehlern bei. Solche Abschattungseffekte, die tiefer im Volumen liegende Strukturen verfälschen, können zu Fehlinterpretationen von Volumendaten führen.

Fluoreszierende Moleküle bleichen aufgrund von häufigen Anregungen und nach Kon-

takt mit dem Luftsauerstoff langsam aus und emittieren immer weniger Fluoreszenzstrahlung. Darüber hinaus wird die Fluoreszenzstrahlung mit zunehmender Tiefe der optisch erfassten Schichtbilder in der Gewebeprobe immer schwächer, da die Fluorophore nicht beliebig weit in das Gewebe hinein diffundieren können und tiefer im Gewebe emittierte Photonen von den darüberliegenden Zellschichten absorbiert werden.

Als Rauschquellen sind in einem CLSM-System das Detektorrauschen (Dunkelrauschen, Sekundäremissionsrauschen), das Laserrauschen und das Schrotrauschen des Lichtes von Bedeutung [WGGH 2000]. Diese Rauschquellen sind in der Regel statistischer Natur. Dunkelrauschen resultiert aus der Generierung von thermischen Dunkelektronen. Es ist unabhängig von der Detektorbeleuchtung und kann durch Kühlung des Detektors verringert werden. Die Ursache für das Sekundäremissionsrauschen (multiplikatives Rauschen) liegt in der zufälligen Schwankung der Vervielfachung der Photoelektronen an den Dynoden des Photomultipliers. Das Laserrauschen entsteht durch zufällige Schwankungen der Besetzung angeregter Zustände im Lasermedium. Es ist proportional zur Signalthöhe und somit bei einer entsprechend großen Anzahl detektierter Photonen von Relevanz. Schrotrauschen (Poissonrauschen) liegt in der Quantennatur des Lichtes begründet, folglich treffen die Photonen in zufällig verteilten Zeitabständen am Detektor ein.

3.1.3. Erzeugung der optisch erfassten Schichtbilder

Wie bereits erwähnt, macht man sich bei der Generierung der zweidimensionalen Objektinformation die Fluoreszenz von Antikörpern bestimmter Zelltypen, den Fluorophoren, zunutze. Die fluoreszenzoptische Doppelfärbung erfolgt an mittels Skalpell gewonnenen, einen Millimeter dicken Präparatscheiben. Nachdem diese chemisch behandelt wurden, inkubiert man sie mit einem Antikörper gegen α -SM-Aktin, einem Marker für Muskelzellen. Die Präparatscheiben werden ein weiteres Mal mit einem sekundären Marker, der aus FITC-konjugierten Antikörpern besteht, inkubiert. Dieser koppelt sich an die Antikörper gegen α -SM-Aktin. Schließlich erfolgt eine dritte und letzte Inkubation der Präparate mit TRITC-gekoppeltem UEA-I-Lektin, einem Marker für Endothelzellen. Ist die Doppelfärbung abgeschlossen, werden die Präparatscheiben als Feuchtpräparat auf einem Objektträger aufgebracht. Die Präparate sind nun für die Bilderzeugung vorbereitet [Züc 2004].

Im CLSM wird die Gewebeprobe mit einem fokussierten Laserstrahl zeilenweise abgerastert und die emittierte Fluoreszenzstrahlung punktweise am jeweiligen Probenort gemes-

sen. Für jeden der beiden Fluoreszenzfarbstoffe benutzt man einen speziellen Emissionsfilter. Nach der Umwandlung der Fluoreszenzstrahlung in ein elektrisches Signal erfolgt dessen Digitalisierung. Die von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierten Wellenlängen betragen 568 nm (Grünanregung für das TRITC-Fluorochrom) und 488 nm (Blauanregung für das FITC-Fluorochrom).

3.1.4. Resultate

Für jede optische Schnittebene werden acht Bilder aufgenommen und gemittelt, um eine Reduzierung des Rauschens zu erreichen. Mehrere solche Bilder aus unterschiedlichen Schnittebenen stellen die Schichten eines Volumendatensatzes dar. Der Inhalt der Schichtbilder besteht jedoch nicht aus der Abbildung einzelner Gewebezellen. Bildinhalt sind Konzentrationen von spezifischen Markern, die sich an die jeweiligen Zelltypen anknüpfen - ein hoher Intensitätswert eines Pixels ist also nicht mit einer besonders großen Zelle gleichzusetzen, sondern weist auf eine hohe Konzentration der spezifischen Marker an dieser Stelle des Gewebes hin.

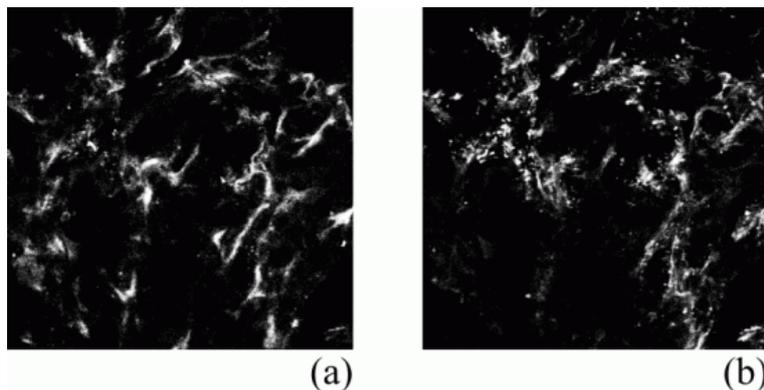


Abbildung 3.2.: Schichtbilder von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b)

Die erzeugten Schichtbilder (Grauwertbilder, 8 Bit) haben üblicherweise eine Auflösung von 512×512 Pixel und bilden eine Fläche von $800 \mu\text{m} \times 800 \mu\text{m}$ ab. Jedes Pixel entspricht somit einer Fläche von $1.56 \mu\text{m} \times 1.56 \mu\text{m}$ (ca. $2.43 \mu\text{m}^2$). Der Abstand der einzelnen optisch erfassten Schichtbilder des Gewebes liegt bei $1.54 \mu\text{m}$. Aufgenommen wurden die Bilder mit einem Leica TCS 4D konfokalen Laser Scanning Mikroskop

(Argon-Krypton-Laser) unter Verwendung des 10er Luftobjektives. In Abbildung 3.2 sind jeweils die Schichtbilder 36 von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) der Perfusionsserie 09 dargestellt.

3.2. Vorverarbeitung der Datensätze

Nachdem die einzelnen Schichtbilder für die jeweiligen Zelltypen eines Gewebevolumens im CLSM erzeugt worden sind, müssen sie zunächst entfaltet, zu Volumendatensätzen zusammengeführt und diese dann für die weitere Bildanalyse aufbereitet werden. Wie bereits in den Ausführungen zur Bilderzeugung erläutert, ist die Qualität der Schichtbilder durch bestimmte Rauschquellen beeinträchtigt. Der folgende Abschnitt behandelt die Entfaltung (auch Dekonvolution genannt) des Bildmaterials [Ric 1972]/[Luc 1974] und eine Methode zur Entfernung des Rauschens in den Volumendatensätzen, welche die in den Datensätzen enthaltenen Strukturen glättet und nach Möglichkeit verstärkt. Zusätzlich wird der Inhalt des Muskeldatensatzes insofern korrigiert, dass die in ihm enthaltenen, durch seine Voxelwerte repräsentierten Strukturen hinterher von denen des Endotheldatensatzes räumlich disjunkt sind [KF 2002].

3.2.1. Dekonvolution des Bildmaterials

Das größte Problem bei der Fluoreszenzmikroskopie besteht im Auftreten von Überstrahlungen, Verzerrungen und Unschärfe in den erzeugten Schichtbildern bedingt durch Beugungserscheinungen und Streulicht aus Bereichen außerhalb der aktuellen Fokusebene. Mittels eines CLSM aufgenommene Bilder zeichnen sich oft durch eine Verminderung des Kontrastes bzw. eine Verschleierung der Präparatefeinstruktur aus - schlimmstenfalls entsteht unbrauchbares Bildmaterial.

Die Dekonvolution stellt ein mathematisches Verfahren dar, mit welchem die oben genannten Effekte korrigiert werden können. Ein entfaltetes Bild besitzt, im Gegensatz zu seinem Originalbild, einen höheren Grad an Schärfe, ist besser aufgelöst und detailreicher.

Die optisch erfassten Schichtbilder eines Datensatzes enthalten Streulichtanteile und Beugungserscheinungen, was mathematisch gesehen als Faltung (Konvolution) des Quells-

gnals, also der tatsächlichen Verteilung der Fluorophore im Gewebe, mit einem Störsignal, der PSF des CLSM, betrachtet werden kann.

$$B(\vec{r}) = O(\vec{r}) \otimes PSF(\vec{r}) \quad (3.1)$$

Hierbei entspricht $B(\vec{r})$ der Intensitätsverteilung im erzeugten Schichtbild, $O(\vec{r})$ der Objektintensitätsverteilung in der Bildebene wie sie ohne Störeffekte abgebildet worden wäre, $PSF(\vec{r})$ der PSF des CLSM und \vec{r} der Ortskoordinate im Schichtbild.

Eine Faltung ist im Prinzip eine eindeutige und somit umkehrbare Abbildung. Ist die PSF bekannt, könnte aus den erzeugten Schichtbildern die unendlich aufgelöste Bildinformation $O(\vec{r})$ extrahiert werden. In der Praxis sind jedoch die Messgrößen $B(\vec{r})$ und $PSF(\vec{r})$ fehlerbehaftet und deren räumliche Abtastdichte kann nicht unendlich erhöht werden.

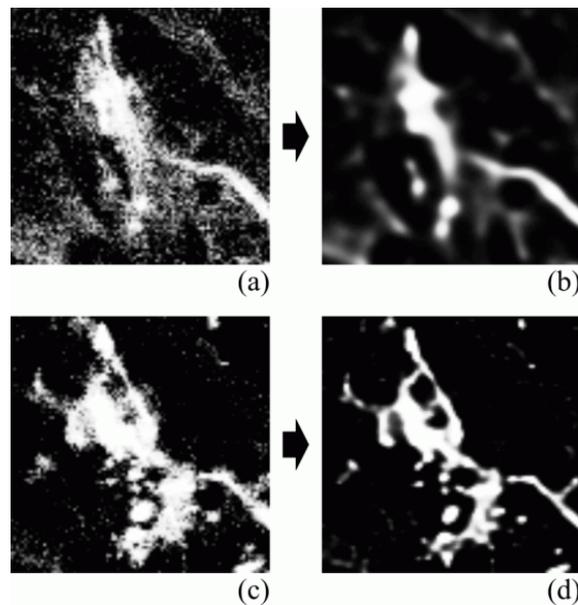


Abbildung 3.3.: Endothel- (a) und Muskelstrukturen (c) sowie ihre entfalteten Gegenstücke (b) und (d)

Mittels der Dekonvolution des Bildmaterials versucht man nun, die tatsächliche Verteilung der Fluorophore im Gewebe aus den erzeugten Schichtbildern heraus zu rekonstruieren.

Für den Bereich der konfokalen Mikroskopie wurden verschiedene Dekonvolutionsalgorithmen wie zum Beispiel von Carrington [KVVV 1997], Tikhonov-Miller [KVVV 1997] und Richardson-Lucy [Ric 1972]/[Luc 1974] vorgestellt. In der vorliegenden Arbeit findet der Richardson-Lucy Algorithmus Verwendung.

Der Richardson-Lucy Algorithmus ermittelt die Beschaffenheit des Originalbildes durch eine Schätzung. Dieses geschätzte Bild wird mit der PSF verzerrt und das Resultat mit dem optisch erfassten Schichtbild verglichen. Aus diesem Vergleich wird mit Hilfe von Maximum-Likelihood-Methoden eine neuerliche Schätzung des Originalbildes errechnet. Dies geschieht so lange, bis das Ergebnis der PSF-Verzerrung und das optisch erfasste Schichtbild einander hinreichend ähneln, die Dekonvolution also konvergiert. Von Bild zu Bild kann die Anzahl der Iterationen stark variieren - in einigen Fällen ist es jedoch auch möglich, dass die Dekonvolution nicht konvergiert. In Abbildung 3.3 ist in der Ausschnittsvergrößerung eines Schichtbildes die Wirkungsweise der Dekonvolution von Endothel- und Muskelstrukturen dargestellt.

3.2.2. Zusammenführen der Schichtbilder

Nach der Dekonvolution werden die optisch erfassten Schichtbilder beider Zelltypen eines Gewebevolumentensatzes zu Volumendatensätzen, Endothel- und Muskeldatensatz, zusammengeführt. Die entstandenen Volumendatensätze haben eine Auflösung von $512 \times 512 \times 40$ Voxeln (entspricht $800 \mu\text{m} \times 800 \mu\text{m} \times 60 \mu\text{m}$ Gewebevolumen) und sind reellwertig. Ein Voxel repräsentiert das Volumen von $1.56 \mu\text{m} \times 1.56 \mu\text{m} \times 1.54 \mu\text{m}$ Gewebe (ca. $3.75 \mu\text{m}^3$).

3.2.3. Glättung und Ausheilung der Volumendatensätze

Die Glättung und Ausheilung der Volumendatensätze erfolgt mittels eines, von Dr. J.-P. Kuska und Dr. Dr. B. Frerich im Jahre 2002 [KF 2002] vorgestellten, gekoppelten anisotropen nichtlinearen Reaktionsdiffusionssystems. Dieses entfernt das Rauschen aus den Volumendatensätzen, ohne die in ihnen enthaltene Information zu zerstören. Eine reine Glättung der Volumendatensätze wäre zwar möglich, würde jedoch das Rauschen genauso wie die feinen Strukturen des Endothel- und Muskeldatensatzes entfernen und somit unbrauchbare Datensätze erzeugen. Das gekoppelte anisotrope nichtlineare Reaktionsdiffusionssystem hingegen glättet beide Volumendatensätze und verstärkt gleichzeitig die

in ihnen enthaltenen, feinen Endothel- und Muskelstrukturen. Dieses Verstärken feiner Strukturen bezeichnet man auch als Ausheilung. Weiteres Augenmerk muss auf den Umstand gerichtet werden, dass ein und dieselbe Voxelposition nicht gleichzeitig im Endothel datensatz Bestandteil einer Endothelstruktur und im Muskeldatensatz Bestandteil einer Muskelstruktur sein kann. Die zu Strukturen im Endothel- und Muskeldatensatz gehörenden Voxelmengen müssen also disjunkt sein, Überlappungen dürfen nicht vorkommen. Da sich bei der Bilderzeugung die spezifischen Marker nicht nur an genau den Stellen des Gewebes befinden, an denen die durch sie zu markierenden Zellen liegen und darüber hinaus noch diverse Rauschquellen ihren Beitrag zur Verschlechterung der Bildqualität liefern, sind die Voxelmengen der unbearbeiteten Volumendatensätze nicht disjunkt. Erst nachdem sie geglättet, ausgeheilt und Endothel- und Muskeldatensatz in disjunkte Voxelmengen unterteilt worden sind, können die relevanten Merkmale aus ihnen extrahiert werden.

Als Lösung für die Glättung der Volumendatensätze bietet sich eine anisotrope nichtlineare Diffusion an. Bei einem Diffusionsprozess werden die Intensitäten der Voxel als Konzentrationen eines Stoffes aufgefasst. Ein hoher Intensitätswert entspricht dabei einer hohen Stoffkonzentration und ein niedriger Intensitätswert einer niedrigen Stoffkonzentration. Das Diffusionssystem versucht nun, durch Flüsse zwischen benachbarten Voxel Konzentrationseinheiten auszugleichen. Bei einem isotropen Diffusionssystem findet ein Fluss parallel zum Gradienten statt. Der Gradient bezeichnet das Gefälle bzw. den Anstieg einer Größe auf einer bestimmten Strecke und wird hier in Bezug auf die Grauwertänderung zwischen benachbarten Voxel verwendet. Die Folge sind immer weiter auflösende Kanten und dementsprechend verschwinden im Verlauf der Diffusion allmählich die Strukturen in den Volumendatensätzen. Es ist also erstrebenswert, dass der Fluss senkrecht zum Gradienten verstärkt wird, damit die Diffusion nur noch entlang der Kanten stattfindet. Das ist bei der anisotropen nichtlinearen Diffusion der Fall: Die Kanten werden verstärkt und unterbrochene Strukturen geschlossen. Zur Drehung des Gradienten wird ein Diffusionstensor berechnet, der die lokale Struktur approximiert und den Fluss in Richtung des Gradienten behindert.

In Abbildung 3.4 ist anhand einer Ausschnittsvergrößerung der Unterschied zwischen isotroper und anisotroper nichtlinearer Diffusion dargestellt. Ausgehend vom Originalbild (a) ist die Wirkungsweise beider Diffusionsprozesse nach jeweils 10, 20, 40 und 80 Zeitschritten zu sehen. In den Bildern (b)-(e) erkennt man, wie der isotrope Diffusionsprozess die feinen Strukturen des Bildes, insbesondere die Barthaare des Pavians, verwischt. Der anisotrope Diffusionsprozess glättet das Bild, erhält jedoch die Barthaare des Pavians, wie in den Bildern (f)-(i) zu sehen ist.

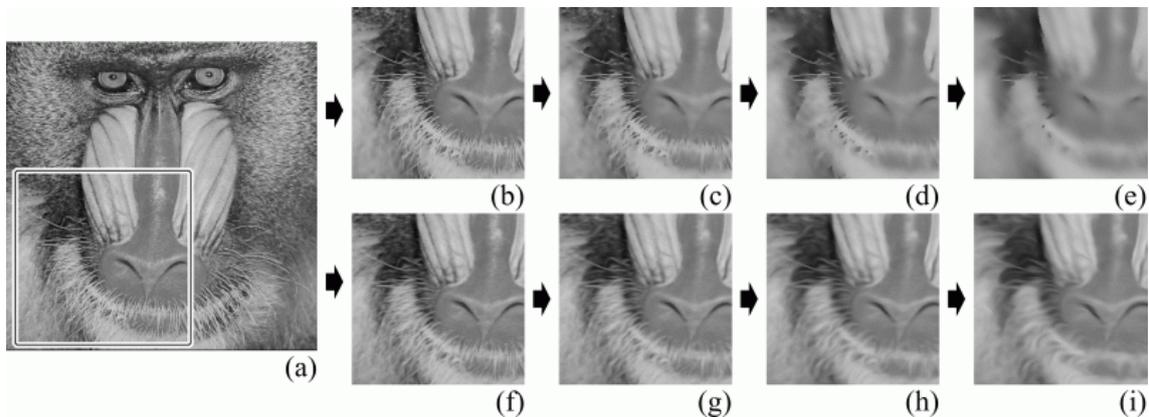


Abbildung 3.4.: Originalbild (a) und isotrope (b)-(e) bzw. anisotrope (f)-(i) nichtlineare Diffusion eines Bildausschnitts

Die praktische Anwendung liefert sehr gute Ergebnisse. Zum einen wird das Rauschen effektiv entfernt und die linearen Strukturen bleiben erhalten. Desweiteren werden unterbrochene Strukturen rekonstruiert, also ausgeheilt.

Die Trennung der zu Strukturen gehörenden Voxelmengen von Endothel- und Muskeldatensatz in disjunkte Mengen ist durch ein einfaches Ausmaskieren nicht möglich, da dadurch die Kohärenz des Muskeldatensatzes eventuell zerstört würde und der Diffusionsprozess die Maskierung wieder verwischt. Stattdessen werden die beiden Diffusionen des Endothel- und Muskeldatensatzes gekoppelt, wobei die zu Strukturen im Muskeldatensatz gehörenden Voxel M durch einen von den zu Strukturen im Endothel datensatz gehörenden Voxel C katalysierten Zerfall mit einer Reaktionslaufzahl k zerstört werden.



Diese Kopplung der beiden anisotropen nichtlinearen Diffusionssysteme ermöglicht die Erzeugung von disjunkten Voxelmengen, ohne die Kohärenz des Muskeldatensatzes zu zerstören. Abbildung 3.5 zeigt in der Ausschnittsvergrößerung eines Schichtbildes die Wirkungsweise des gekoppelten anisotropen nichtlinearen Reaktionsdiffusionssystems auf bereits entfaltete Endothel- und Muskelstrukturen.

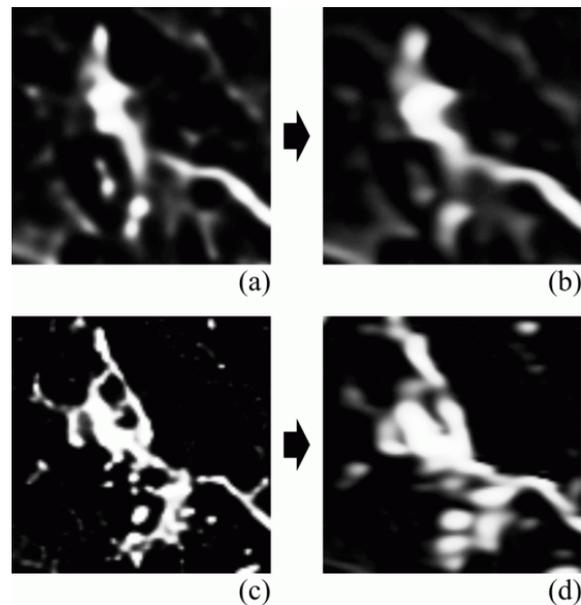


Abbildung 3.5.: Entfaltete Endothel- (a) und Muskelstrukturen (c) sowie ihre geglätteten Gegenstücke (b) und (d)

3.2.4. Resultate

In Abbildung 3.6 sind jeweils die Schichtbilder 36 von Endothel- und Muskeldatensatz der Perfusionsserie 09 in den Stadien der Vorverarbeitung dargestellt. Aus den unbearbeiteten Originalbildern entsteht durch Dekonvolution und Glättung Bildmaterial, welches kontrastreicher und für die Berechnung des Bedeckungsgrades weitaus besser geeignet ist. Das Rauschen wurde aus den Schichtbildern entfernt, Gewebestrukturen ausgeheilt und geglättet.

3.3. Bedeckungsgrad

Die Stabilisierung des Kapillarnetzwerkes mittels an die Blutgefäße angelagerter Muskelzellen spielt beim Gewebewachstum eine wichtige Rolle [KF 2002]. Die Muskelzellen umschließen die Kapillaren und verhindern so ein Zusammendrücken derselben. Das

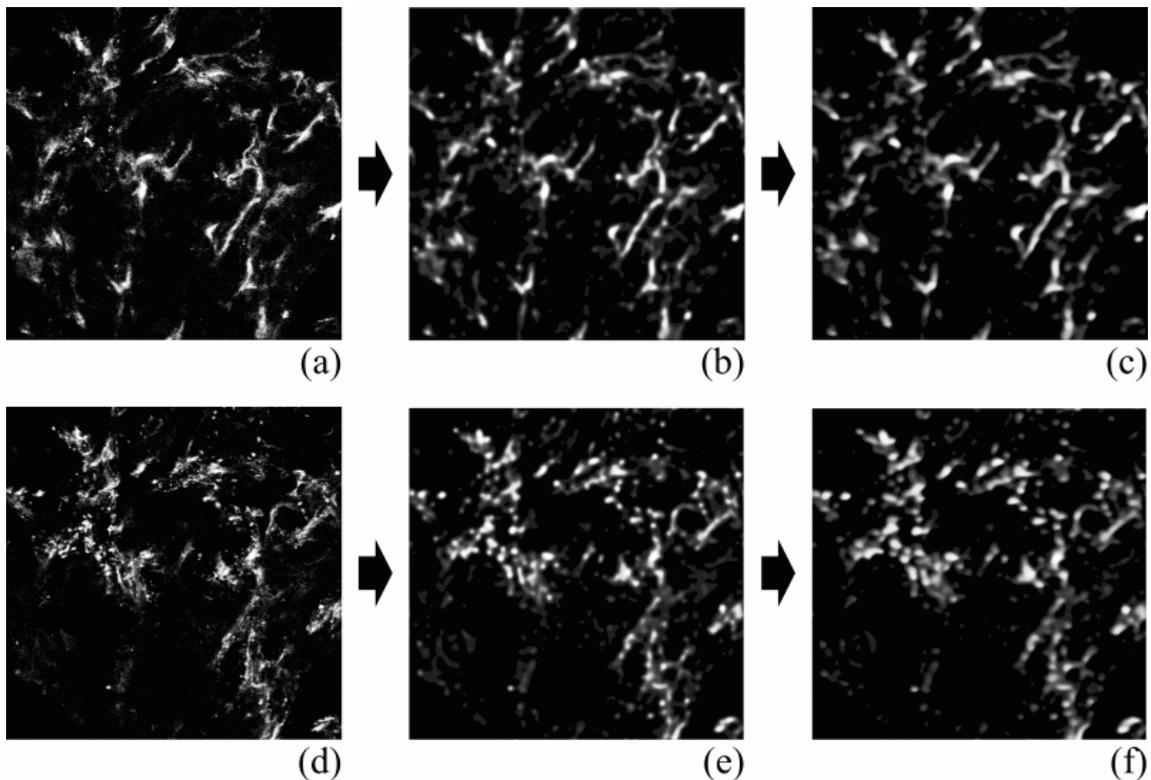


Abbildung 3.6.: Unbearbeitete (a) bzw. (d), entfaltete (b) bzw. (e) und geglättete Schichtbilder (c) bzw. (f) Bilder von Endothel- und Muskeldatensatz

Gewebe kann also mechanisch beansprucht werden, ohne dass die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen dabei unterbunden wird. Je größer der Bedeckungsgrad, desto stabiler das Gefäßnetzwerk. Somit ist der Bedeckungsgrad der Kapillaren mit Muskelzellen ebenfalls ein wichtiger Reifungsparameter.

Im Gegensatz zur klassischen Definition des Bedeckungsgrades, nämlich dem Grad der Bedeckung einer Oberfläche mit einer netzförmigen Struktur, wird dieser hier nicht mit organischen Zellen oder Partikeln, sondern mit Stoffkonzentrationen auf einem diskreten dreidimensionalen Raster in Verbindung gebracht. In den erzeugten Volumendatensätzen sind keine Strukturen aus Zellen, sondern Konzentrationen von Fluoreszenzfarbstoffen enthalten - die Zellen sind nur indirekt sichtbar. Die Ermittlung des maximalen Bedeckungsgrades kommt somit der Suche nach der wirklichen, mit Muskelzellen bedeckten Oberfläche der Kapillaren gleich. Mit Oberfläche ist hierbei die Außenfläche der Ka-

pillaren gemeint. Die Ermittlung des maximalen Bedeckungsgrads erfolgt mithilfe eines Schwellwertes. Es handelt sich dabei um den optimalen Schwellwert zur weiteren Verarbeitung (Binarisierung) des Endotheldatensatzes.

Der optimale Schwellwert ist abhängig von den Messdaten, sowie deren Qualität, und den Parametern des gekoppelten anisotropen nichtlinearen Reaktionsdiffusionssystems. Maximale Bedeckung entspricht dem optimalen Schwellwert - bei einem zu kleinen oder zu großen Schwellwert haben die Konzentrationen der Endothel- und Muskelzellen nicht genügend Kontakt zueinander und liefern deshalb keinen Beitrag zur Berechnung des Bedeckungsgrades. Dieser Sachverhalt wird in den räumlichen Verteilungen der jeweiligen Zelltypen im Gewebe deutlich. Dort, wo die realen Verteilungen beider Zelltypen miteinander Kontakt haben, ist der Bedeckungsgrad maximal und der optimale Schwellwert zu finden.

Der erste Schritt zur Berechnung des optimalen Schwellwertes unter Verwendung eines variierenden Schwellwertes [KF 2002] besteht in der Ermittlung des Intervalls, in welchem die Berechnung stattfinden soll. Die untere Intervallgrenze ist gleich dem Maximum der kleinsten Voxelwerte beider Volumendatensätze und die obere gleich dem Minimum der größten Voxelwerte beider Volumendatensätze. Die Schrittweite des variierenden Schwellwertes beträgt 0.1 % der gesamten Intervallbreite - die Berechnung des maximalen Bedeckungsgrades erfolgt also ausreichend genau.

In jedem Schritt werden zunächst alle Oberflächenvoxel des Endotheldatensatzes ermittelt. Diese zeichnen sich durch einen Wert größer gleich dem Schwellwert aus und müssen in der direkten Nachbarschaft mindestens ein Voxel haben, dessen Wert kleiner als der Schwellwert ist. Um den Bedeckungsgrad zu berechnen, wird nun für die ermittelten Oberflächenvoxel überprüft, ob der Wert des jeweils zugehörigen Voxels im Muskeldatensatz ebenfalls größer gleich dem Schwellwert ist. In diesem Fall gilt das Oberflächenvoxel als bedeckt, ansonsten gilt es als unbedeckt. Das Verhältnis von bedeckten Oberflächenvoxeln zu allen Oberflächenvoxeln bildet den Bedeckungsgrad.

Bei den anfänglich recht kleinen Schwellwerten sind fast alle Oberflächenvoxel des Endotheldatensatzes bedeckt. Mit wachsendem Schwellwert sinkt der Bedeckungsgrad dann stark ab, steigt wieder an und geht allmählich gegen 0. Das Intervall zwischen dem Minimum des Bedeckungsgrades nach dem starken Absinken und der oberen Grenze des Berechnungsintervalls bildet den interessierenden Bereich, in welchem ein Maximum zu finden ist. Dieses Maximum entspricht dem maximalen Bedeckungsgrad, und der assoziierte Schwellwert ist mit dem optimalen Schwellwert identisch.

3.3.1. Resultate

In Abbildung 3.7 sind jeweils die Schichtbilder 36 des vorverarbeiteten Endothel- und Muskeldatensatzes der Perfusionsserie 09 sowie das Diagramm ihres Bedeckungsgrades dargestellt. Der maximale Bedeckungsgrad beträgt 47.6% und der damit verbundene optimale Schwellwert 3.1, wie man der Ausschnittsvergrößerung entnehmen kann.

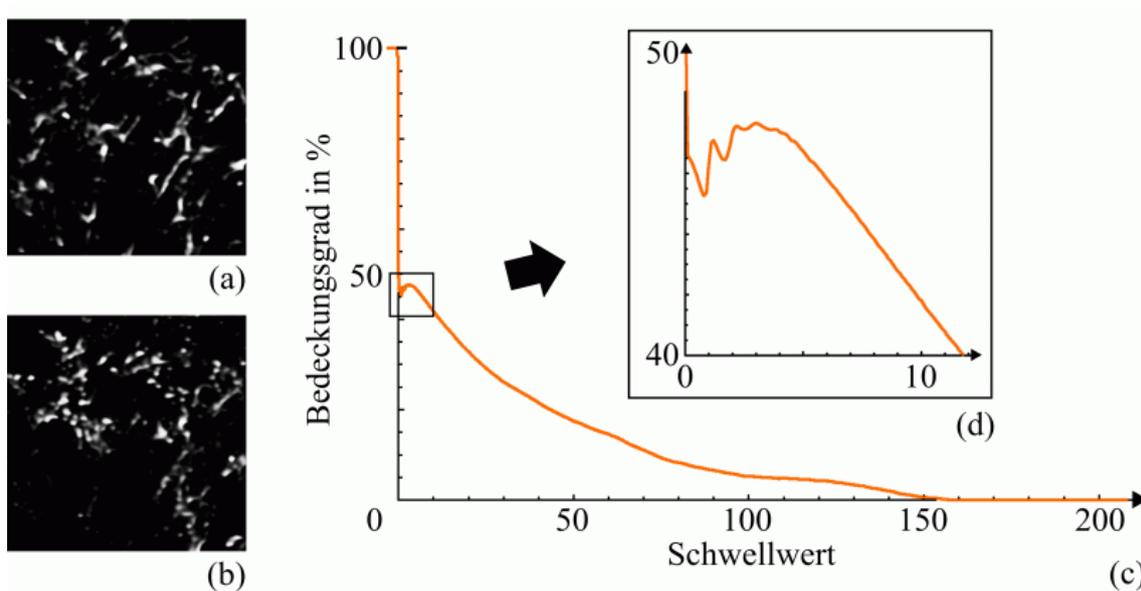


Abbildung 3.7.: Vorverarbeitete Schichtbilder von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie der maximale Bedeckungsgrad der Datensätze (c)

3.4. Schwellwert

Um den reellwertigen Endothel datensatz weiter analysieren zu können, muss er in einen binären Datensatz umgewandelt werden. Dies geschieht mithilfe eines Schwellwertoperators, θ bezeichnet hierbei den Schwellwert.

$$g_{x,y,z} = \begin{cases} 1, & f_{x,y,z} \geq \theta \\ 0, & f_{x,y,z} < \theta \end{cases} \quad (3.3)$$

Der optimale Schwellwert für den Volumendatensatz wurde bereits bei der Ermittlung des Bedeckungsgrades bestimmt. Doch wendet man diesen Schwellwert auf den Endotheldatensatz an, so kann ein für die weiteren Analysen ungeeigneter Binärdatensatz entstehen wie aus Abbildung 3.8 ersichtlich ist. Große Bereiche des Volumendatensatzes sind komplett in eine Objektkomponente umgewandelt worden. Eine sinnvolle Skelettierung kann nicht erfolgen, da sich in diesen Bereichen keine kapillaren Strukturen mehr befinden.

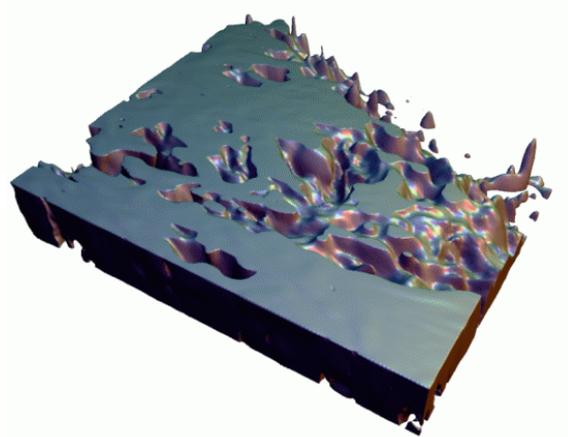


Abbildung 3.8.: Mit festem Schwellwert binarisierter Endothelzelldatensatz

Anstatt eines festen Schwellwertes benötigt man hier einen adaptiven Schwellwert. Für jedes Voxel, und abhängig von dessen Umgebung, wird dabei eine binäre Klassifizierungsentscheidung getroffen. Das Ergebnis ist ein Binärdatensatz mit klar erkennbaren kapillaren Strukturen. Um dieses Ziel zu erreichen, nutzt man den lokalen Grauwertgradienten jedes Voxels im Volumendatensatz und bedient sich der Gaußschen Fehlerfunktion.

3.4.1. Grundlagen

Die Gaußverteilung ist definiert durch

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}} \quad (3.4)$$

mit dem Mittelwert μ und der Standardabweichung σ . Bei der Standardnormalverteilung nehmen μ den Wert 0 und σ den Wert 1 an. Die Gaußsche Fehlerfunktion bezeichnet das Integral der Gaußverteilung und wird definiert durch

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-t^2} dt. \quad (3.5)$$

Die die wohl bekannteste Fehlerfunktion ist die Kumulative Verteilungsfunktion der Standardnormalverteilung mit $\frac{-x^2}{2}$ im Exponenten. Sind Ergebnisse einer Messung normalverteilt mit der Standardabweichung σ , dann entspricht $\operatorname{erf}\left(\frac{a}{\sigma\sqrt{2}}\right)$ der Wahrscheinlichkeit, dass der Fehler eines einzelnen Messergebnisses im Intervall $[-a, a]$ liegt. Dieses Intervall bezeichnet man auch als Konfidenzintervall.

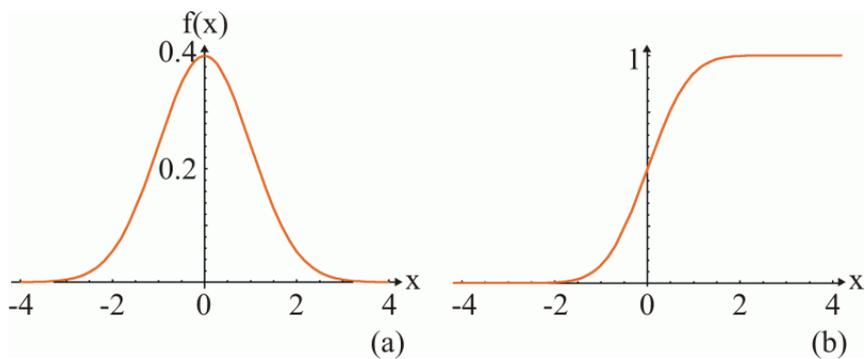


Abbildung 3.9.: Die Standardnormalverteilung (a) und ihre Kumulative Verteilungsfunktion (b)

Die Gaußsche Fehlerfunktion ist eine stetige Funktion und wird durch den Faktor $\frac{2}{\pi}$ auf 1 normalisiert. In den meisten Computeralgebrasystemen ist $\operatorname{erf}(x)$ implementiert. Bei Mathematica berechnet sich die Fehlerfunktion einer Variablen x mithilfe des Ausdrucks $\operatorname{Erf}[x]$. Eine gute rationale Approximation liefert die Formel 7.1.27 in [AS 1984]. Die Abweichung $\varepsilon(x)$ dieser rationalen Approximation der Fehlerfunktion vom tatsächlichen Wert für $\operatorname{erf}(x)$ ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

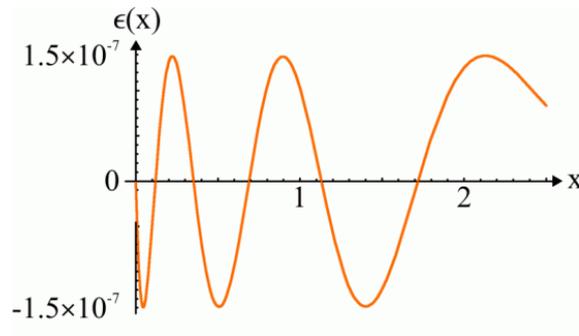


Abbildung 3.10.: Fehler der rationalen Approximation im Intervall [0,2.5]

3.4.2. Binarisierung des Volumens

Im Allgemeinen erfolgt die Binarisierung eines reellwertigen Volumendatensatzes mittels einer feststehenden binären Klassifizierungsentscheidung - also mittels eines festen Schwellwertes. Lässt sich ein Binärdatensatz nicht besonders gut skelettieren, weil er zum Beispiel fast komplett mit Objektvoxeln angefüllt ist und sich folglich keine eindeutigen Strukturen in ihm befinden, kann man - auch unter Zuhilfenahme des festen Schwellwertes - noch andere berechenbare Merkmale des Volumendatensatzes zu einer Entscheidungsfindung heranziehen. Ein solches Merkmal ist der Grauwertgradient eines Voxels. Der Betrag des Gradienten berechnet sich mittels

$$|\nabla f_{x,y,z}| \approx \frac{1}{2} \sqrt{(f_{x+1,y,z} - f_{x-1,y,z})^2 + (f_{x,y+1,z} - f_{x,y-1,z})^2 + (f_{x,y,z+1} - f_{x,y,z-1})^2}. \quad (3.6)$$

Die Transformation der Voxelwerte unter Verwendung der Gaußschen Fehlerfunktion geschieht durch

$$g_{x,y,z} = \operatorname{erf} \left(\frac{|\nabla f_{x,y,z}| * (f_{x,y,z} - \mu)}{\sqrt{2\sigma^2}} \right), \quad (3.7)$$

wobei μ mit dem optimalen Schwellwert identisch ist und $f_{x,y,z}$ dem Wert des aktuell betrachteten Voxels entspricht. Voxel, deren Werte deutlich größer oder kleiner als der Wert des optimalen Schwellwertes sind, erhalten einen neuen Wert, sehr nahe an -1 bzw.

1. Ein Voxelwert, der dem optimalen Schwellwert entspricht, wird auf die 0 abgebildet. Je kleiner man σ wählt, desto mehr Voxel erhalten Werte sehr nahe -1 bzw. 1 und desto weniger Voxel einen Wert zwischen -1 und 1. Umgekehrt nehmen immer mehr Voxel einen Wert zwischen -1 und 1 an, je größer σ gewählt wird. $\nabla f_{x,y,z}$ gewichtet das Ergebnis von $(f_{x,y,z} - \mu)$ und stellt das Kernstück des adaptiven Schwellwertes dar. Ein hoher Grauwertgradient weist auf eine scharfe Kante innerhalb des Volumendatensatzes hin, welche auch im transformierten Datensatz enthalten sein muss, und resultiert in einer starken Gewichtung. Ein niedriger Grauwertgradient lässt hingegen auf einen geringen Anstieg der Voxelwerte schließen. Solch ein geringer Anstieg erfährt folglich eine geringere Gewichtung. σ und $\nabla f_{x,y,z}$ sind somit ausschlaggebend für die Verteilung der neuen Voxelwerte und die Genauigkeit der nachfolgenden binären Klassifizierungsentscheidung bezüglich Glattheit und Lokalisation der resultierenden Oberfläche. Der so entstandene zweite Volumendatensatz enthält, im Vergleich zum ersten, anders verteilte Voxelwerte. Die hier vorgestellte Transformation entspricht der Anwendung einer Transferfunktion [Lev 1988] auf die Voxelwerte eines Volumendatensatzes.

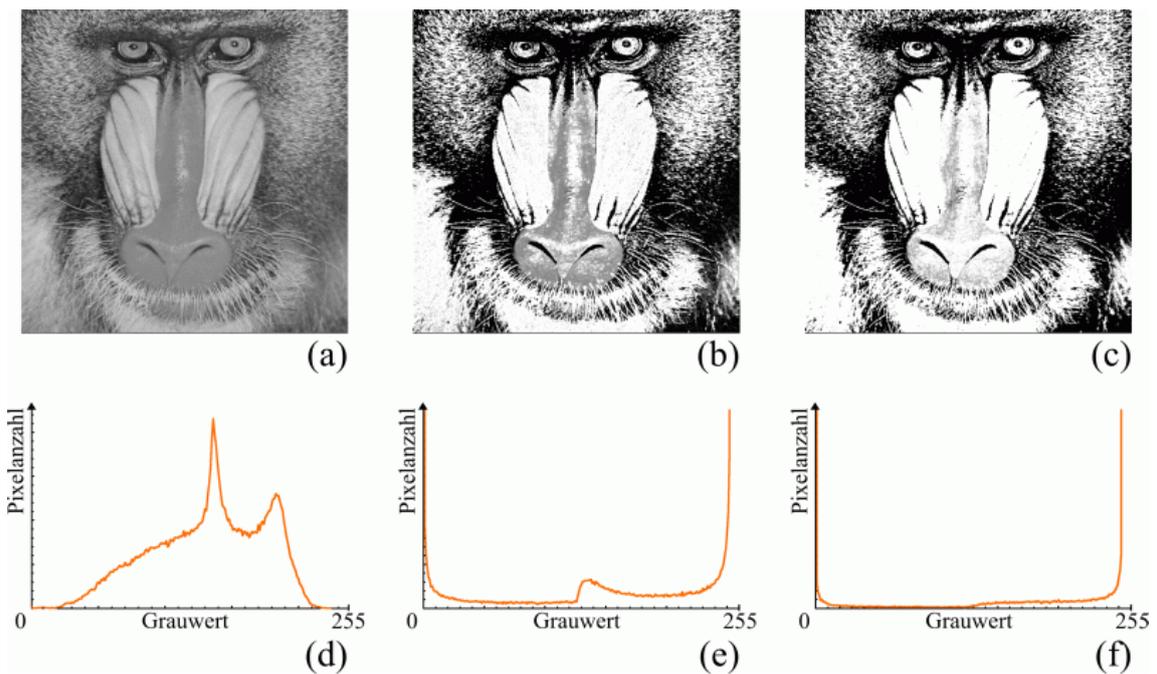


Abbildung 3.11.: Bild und Histogramm ohne Transformation (a) bzw. (d), transformiert mit $\sigma=50$ (b) bzw. (e) und $\sigma=10$ (c) bzw. (f)

In Abbildung 3.11 ist die Verteilung der Grauwerte dreier Bilder anhand ihrer Histogramme dargestellt. Das erste Bild ist unbearbeitet, seine Grauwerte innerhalb des Intervalls $[0,255]$ verteilt. Das zweite Bild wurde mit $\sigma=50$ transformiert. Die Rücktransformation der Grauwerte ins Intervall $[0,255]$ zeigt, dass die Anzahl der Pixel, deren Grauwerte nahe 0 bzw. 255 liegen, gestiegen ist. Das Histogramm, welches die rücktransformierten Grauwerten des mit $\sigma=10$ transformierten dritten Bildes enthält, zeigt die Neuverteilung der Grauwerte im Intervall $[0,255]$ noch deutlicher. Die drei Histogramme spiegeln somit die Wirkungsweise der Transformation wieder, nach welcher die Anzahl der Pixel, deren Grauwerte nach der Rücktransformation nahe 0 bzw. 255 liegen, mit abnehmendem σ steigt.

Um aus dem resultierenden reellen Volumendatensatz nun einen Binärdatensatz zu erhalten, bedient man sich eines zweiten Schwellwertes θ_2 .

$$h_{x,y,z} = \begin{cases} 1, & g_{x,y,z} \geq \theta_2 \\ 0, & g_{x,y,z} < \theta_2 \end{cases} \quad (3.8)$$

Dieser kann dementsprechend nur Werte aus dem Intervall $[-1, 1]$ annehmen. Setzt man θ_2 gleich 0, resultiert dies in einem Binärdatensatz, der mit dem Binärdatensatz identisch ist, der entsteht, wenn man den ursprünglichen Volumendatensatz mit dem optimalen Schwellwert θ binarisiert. Je größer bzw. kleiner θ_2 gewählt wird, desto weniger bzw. mehr Voxel des entstehenden Binärdatensatzes erhalten den Wert 1 und werden in Objektvoxel umgewandelt. Die Prozedur der Transformation der Voxelwerte und der nachfolgenden binären Klassifizierungsentscheidung ist der Anwendung eines adaptiven Schwellwertes gleichzusetzen.

Abhängig vom Produkt des Grauwertgradienten eines Voxels mit der Differenz des Voxelwertes zum optimalen Schwellwert kann eine bessere binäre Klassifizierungsentscheidung getroffen werden, als dies unter alleiniger Verwendung des optimalen Schwellwertes möglich wäre. Denn die Oberfläche der im Binärdatensatz entstandenen Objekte befindet sich nun stellenweise tiefer im Volumen der endothelen Strukturen. Große, komplett mit Objektvoxeln gefüllte Volumenbereiche können hierbei zugunsten gut zu skelettierender Strukturen vermieden werden.

Die Binarisierung unter Verwendung des adaptiven Schwellwertes ist als ein alternatives Verfahren zu sehen. Nur bei solchen Endothel-datensätzen, die nach der Binarisierung mit einem festen Schwellwert vollständig mit Objektvoxeln gefüllte Bereiche besitzen, ist es sinnvoll, eine Binarisierung unter Verwendung des adaptiven Schwellwertes durchzuführen. Die im Ergebnisteil dieser Arbeit untersuchten Datensätze weisen keine solche Berei-

che auf, somit wurde bei ihnen auch nur ein fester Schwellwert zur Binarisierung genutzt. Doch da sich die Forschungen zum Gewebewachstum noch im Anfangsstadium befinden und später einmal Datensätze untersucht werden könnten, bei denen die Binarisierung mit dem adaptiven Schwellwert hilfreich wäre, wurde diese Funktionalität implementiert.

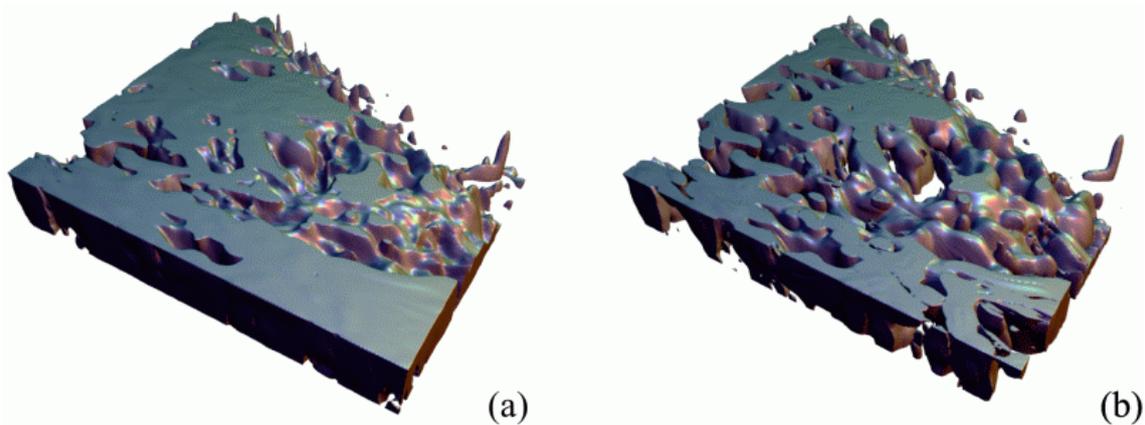


Abbildung 3.12.: Vergleich von festem und adaptivem Schwellwert

Obwohl der adaptive Schwellwert bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Datensätzen keine Verwendung findet, soll seine Wirkungsweise an einem Beispiel demonstriert werden. Abbildung 3.12 zeigt links die Oberfläche eines Volumendatensatzes, nachdem dieser mit dem festen Schwellwert $\theta=5$ binarisiert wurde. Die Oberfläche befindet sich zu einem großen Teil direkt an den Volumengrenzen und die größte Struktur besitzt fast keine Löcher. Eine Skelettierung dieses Binärvolumens erzeugt ein Skelett, welches nicht den Mittelachsen der im Volumen liegenden Endothelstrukturen entspricht. Im rechten Bild ist die Oberfläche desselben Gewebevolumens, welches mit dem adaptiven Schwellwert binarisiert wurde, zu sehen. Als Parameter für den adaptiven Schwellwert sind $\mu=5$, was dem Wert des festen Schwellwertes entspricht, $\sigma=10$ und $\theta_2=0.1$ gewählt worden. Aus zuvor noch von der Oberfläche eingeschlossenen Volumenbereichen haben sich Strukturen herausgebildet, die den im Volumen liegenden Kapillaren entsprechen und skelettiert mit den tatsächlichen Mittelachsen übereinstimmen.

3.4.3. Resultate

In Abbildung 3.13 ist der mit dem festen Schwellwert $\theta=3.1$ binarisierte Endotheldatensatzes der Perfusionsserie 09 zu sehen. Aus Darstellungsgründen wurden nur die Oberflächenvoxel der Endothelstrukturen angezeigt.



Abbildung 3.13.: Der binarisierte Endotheldatensatz

3.5. Kompaktheit der Komponenten

Das Geflecht der Kapillargefäße hat die Aufgabe, die umliegenden Gewebszellen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen. Abhängig von der Form des Gefäßes kann es dieser Aufgabe besser oder schlechter gerecht werden. Je größer die Oberfläche eines Gefäßes im Verhältnis zu seinem Volumen ist, desto mehr Zellen des umliegenden Gewebes haben Kontakt zur Gefäßwand. Folglich werden mehr Zellen versorgt, was insgesamt einer verbesserten Versorgungslage des betrachteten Gewebevolumentens gleichkommt. Dieses Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bezeichnet man als Kompaktheit [Loh 1998]. Ein kapilläres Netzwerk kommt seiner Aufgabe, der Ernährung und Oxygenisierung des umliegenden Gewebes, folglich besser nach, je unkompakter es ist. Um dieses morphologische Merkmal zu gewinnen, müssen die Oberfläche und das Volumen jeder, im Gewebevolumentens liegenden, Komponente berechnet werden. Dazu wird im Folgenden der Marching

Tetrahedron Algorithmus [GH 1994] genutzt, welcher zur Berechnung von Isoflächen aus reellwertigen Volumendatensätzen entwickelt wurde und mittels Interpolation auf einem diskreten Raster die Oberfläche sehr gut rekonstruieren kann. Mit Hilfe der gewonnenen Oberflächendreiecke eines Gefäßes lassen sich direkt die Werte für dessen Oberfläche und Volumen und somit auch die entsprechende Kompaktheit berechnen. Die Kompaktheit stellt ein aussagekräftiges Maß dar, da sie invariant gegenüber Translation, Rotation und Skalierung ist.

3.5.1. Grundlagen

Bevor die genaue Beschreibung des Vorgehens zur Berechnung der Kompaktheit erläutert wird, müssen noch einige Grundlagen geschaffen werden.

Objekt und Hintergrund

Nach der Glättung und Ausheilung der Volumendatensätze kann man eindeutig zwischen Objekt- und Hintergrundvoxeln unterscheiden. Alle Voxel, die einen Grauwert größer oder gleich dem Schwellwert besitzen, sind Objektvoxel und alle Voxel, deren Grauwert kleiner als der Schwellwert ist, sind Hintergrundvoxel. Die Gesamtheit aller Objektvoxel nennt man Objekt und die Gesamtheit aller Hintergrundvoxel wird als Hintergrund bezeichnet. Jeder Volumendatensatz enthält endlich viele Objekt- und Hintergrundvoxel.

Nachbarschaften

In einem diskreten 3D Volumendatensatz gibt es drei verschiedene Arten von Nachbarschaften [MS 1996]. Stellt man sich die einzelnen Voxel als sich berührende Würfel vor und seien $p = (p_x, p_y, p_z)$ und $q = (q_x, q_y, q_z)$ zwei Voxel mit ganzzahligen Koordinaten im 3D Digitalraum Z^3 , dann heißt:

- 6er Nachbarschaft: Die Voxel haben eine Fläche gemeinsam bzw. $|p_x - q_x| + |p_y - q_y| + |p_z - q_z| = 1$ und werden auch als 6-adjazent bezeichnet (Abbildung 3.14 (a));

- 18er Nachbarschaft: Die Voxel haben eine Fläche oder eine Kante gemeinsam bzw. $1 \leq |p_x - q_x| + |p_y - q_y| + |p_z - q_z| \leq 2$ und $\max(|p_x - q_x|, |p_y - q_y|, |p_z - q_z|) = 1$ und werden auch als 18-adjazent bezeichnet (Abbildung 3.14 (b));
- 26er Nachbarschaft: Die Voxel haben eine Fläche, eine Kante oder eine Ecke gemeinsam bzw. $|\max(|p_x - q_x|, |p_y - q_y|, |p_z - q_z|)| = 1$ und werden auch als 26-adjazent bezeichnet (Abbildung 3.14 (c)).

In den von uns betrachteten Volumendatensätzen liegt den Objektvoxeln eine 26er Nachbarschaft und den Hintergrundvoxeln eine 6er Nachbarschaft zugrunde.

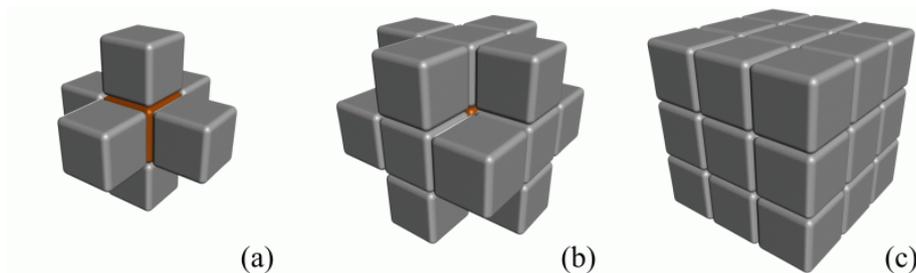


Abbildung 3.14.: Die Nachbarschaften in 3D: 6er (a), 18er (b) und 26er (c) Nachbarschaft

Pfad

Ein Pfad [Loh 1998] von dem Voxel an Position $(p_{x_0}, p_{y_0}, p_{z_0})$ zu dem Voxel an $(p_{x_n}, p_{y_n}, p_{z_n})$ ist eine Sequenz von Voxelpositionen $(p_{x_0}, p_{y_0}, p_{z_0}), (p_{x_1}, p_{y_1}, p_{z_1}), \dots, (p_{x_n}, p_{y_n}, p_{z_n})$, so dass das Voxel an $(p_{x_k}, p_{y_k}, p_{z_k})$ ein Nachbar des Voxels an $(p_{x_{k+1}}, p_{y_{k+1}}, p_{z_{k+1}})$ ist, und zwar für alle k mit $0 \leq k \leq n - 1$. Es gibt, bedingt durch die drei verschiedenen Nachbarschaften, den 6er Pfad, 18er Pfad und 26er Pfad.

Komponenten

Die Gesamtheit aller Objektvoxel unterteilt sich in Komponenten [Loh 1998]. Eine Komponente entspricht allen Objektvoxeln, zwischen denen untereinander ein 26er-Pfad besteht. Man nennt diese Voxel auch verbunden. Es können also mehrere Komponenten in einem Volumendatensatz vorhanden sein. Diese sind per Definition nicht verbunden. Nach

der Segmentierung des Datensatzes können die einzelnen unverbundenen Komponenten getrennt bearbeitet werden.

3.5.2. Ähnliche Algorithmen

A Measure of Compactness for 3D Shapes [Bri 2000]

Dieser Algorithmus aus dem Jahre 2000 stellt die Berechnung der Diskreten Kompaktheit vor, einer Methode zur direkten Berechnung der Kompaktheit aus einem binären, d.h. bereits mit einem Schwellwertoperator bearbeiteten Volumendatensatz heraus. Das Problem klassischer Algorithmen liegt in der Empfindlichkeit gegenüber Rauschen auf der Oberfläche von Objekten, welches sich negativ auf die Berechnung der Kompaktheit auswirkt. Die Diskrete Kompaktheit ist abhängig von der Anzahl der Kontaktflächen zwischen den Voxeln eines Objektes. Hierbei ist es egal, ob es sich bei den Volumenelementen eines Datensatzes um Tetraeder, Hexaeder oder Oktaeder handelt. Der Algorithmus lässt sich auf alle Volumendatensätze, die aus regulären Polyedern aufgebaut sind, anwenden.

Da der Diskreten Kompaktheit die Berechnung von Kontaktflächen zugrunde liegt, kann man sie nur in solchen hexaederbasierten Volumendatensätzen berechnen, die für die Objektvoxel eine 6er Nachbarschaft und für die Hintergrundvoxel eine 26er Nachbarschaft vorsehen. Desweiteren ist es nicht möglich, gleichzeitig mit der Berechnung der Diskreten Kompaktheit auch die Oberfläche der einzelnen Komponenten in Hinblick auf deren Visualisierung zu erzeugen. Aus diesen beiden Gründen wurde der Ansatz in unserer Arbeit nicht genutzt.

3.5.3. Berechnung der Kompaktheit

Die Kompaktheit ist im Allgemeinen durch das Verhältnis von Volumen und Oberfläche definiert und die Kugel stellt den kompaktesten geometrischen Körper dar [Loh 1998]. Alle anderen Körper besitzen eine geringere Kompaktheit. Die Kompaktheit einer Komponente berechnet sich aus ihrem Volumen und ihrer Oberfläche. Die Schwierigkeit besteht nun darin, aus einem segmentierten diskreten Volumendatensatz diese beiden Werte zu extrahieren. Eine Entscheidung, ob ein Voxel innerhalb oder außerhalb einer Komponente liegt, ist recht einfach, jedoch muß die Kontaktfläche zwischen Komponente und

Hintergrund anhand der Voxelwerte erst einmal rekonstruiert werden. Der Marching Tetrahedron Algorithmus (auch Wrapper Algorithmus genannt) [GH 1994], eine Weiterentwicklung des Marching Cubes Algorithmus [LC 1987], stellt eine Lösungsmöglichkeit für dieses Problem dar.

Der Marching Tetrahedron Algorithmus unterteilt das gesamte Volumen in Würfel, welche jeweils aus acht 6-adjazenten Voxeln bestehen. Jeder dieser Würfel wird wiederum in fünf Tetraeder aufgeteilt, wie in Abbildung 3.15 ersichtlich ist. Die Grauwerte der acht Voxel werden den entsprechenden Eckpunkten der Tetraeder zugewiesen.

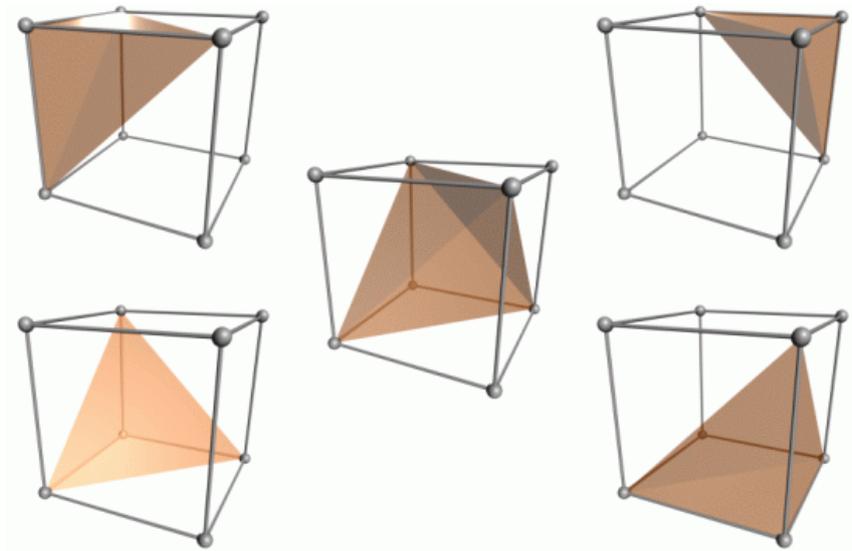


Abbildung 3.15.: Dekomposition eines Würfels in fünf Tetraeder

Entlang der Kanten der einzelnen Tetraeder wird für den Fall eines Überganges von innerhalb der Komponente nach außerhalb der Komponente die Position des Schnittpunktes der Kante mit der Oberfläche interpoliert. Jedes Tetraeder liefert entweder keinen, drei oder vier solche Schnittpunkte, die den Eckpunkten von keinem, einem oder zwei Dreiecken entsprechen. Die Gesamtoberfläche einer Komponente setzt sich aus allen gefundenen Dreiecken zusammen. Das Volumen der einzelnen Tetraeder lässt sich ebenfalls aus den Koordinaten der Dreiecke direkt berechnen. Um die Auflösung des Volumendatensatzes bei der Berechnung von Oberfläche und Volumen mit zu berücksichtigen, werden die drei Raumkoordinaten aller ermittelten Schnittpunkte mit der Abmessung der Voxel in der jeweiligen Raumrichtung multipliziert.

Durch zwei abwechselnd genutzte Tetraederkonfigurationen (gerade, für Voxel bei denen die Summe ihrer Raumkoordinaten gerade ist und ungerade, für Voxel bei denen die Summe ihrer Raumkoordinaten ungerade ist) wird sichergestellt, dass die Kanten angrenzender Würfel nahtlos sind und die rekonstruierte Oberfläche somit keine Sprünge aufweist. Dies ist notwendig, um eine für die Berechnung der Kompaktheit und anschließende Visualisierung der Komponenten geschlossene Oberfläche zu erhalten. Abbildung 3.16 zeigt diese beiden Tetraederkonfigurationen.

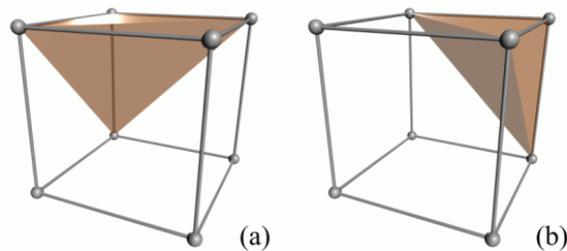


Abbildung 3.16.: Gerade (a) und ungerade (b) Tetraederkonfiguration

Der Marching Tetrahedron Algorithmus liest nacheinander alle $2 \times 2 \times 2$ Würfel eines Volumendatensatzes ein und überprüft, wie viele der acht Voxel innerhalb einer Komponente liegen. Die Entscheidung, ob ein Voxel Bestandteil einer Objektkomponente ist, hängt vom Schwellwert ab. Ist der Voxelwert gleich oder größer dem Schwellwert, so gehört das betreffende Voxel zu einer Komponente. Abhängig von der Konfiguration ihrer Eckpunkte werden die $2 \times 2 \times 2$ Würfel in drei Klassen eingeteilt.

- Die Werte aller acht Voxel sind kleiner als der Schwellwert: Der $2 \times 2 \times 2$ Würfel liegt komplett außerhalb einer Komponente. Er steuert keinen Beitrag zur Berechnung der Oberfläche bzw. des Volumens bei. Hier ist keine weitere Betrachtung vonnöten, es kann der nächste Würfel eingelesen werden. Dieser Fall ist in Abbildung 3.17 (a) dargestellt.
- Die Werte aller acht Voxel sind größer oder gleich dem Schwellwert: Der $2 \times 2 \times 2$ Würfel liegt komplett innerhalb einer Komponente. Er steuert keinen Beitrag zur Berechnung der Oberfläche, wohl aber zur Berechnung des Volumens bei. Sein Volumen wird zum Gesamtvolumen hinzuaddiert. Danach kann der nächste Würfel eingelesen werden. Dieser Fall ist in Abbildung 3.17 (c) dargestellt.
- Die Werte der acht Voxel sind teilweise kleiner als der Schwellwert und teilweise größer gleich dem Schwellwert: Der $2 \times 2 \times 2$ Würfel liegt zum Teil außerhalb und

zum Teil innerhalb einer Komponente - er wird von der Komponentenoberfläche geschnitten. Es gilt, die Oberfläche zu finden, die das Innere der Komponente vom Hintergrund trennt, danach ihre Fläche und zusätzlich das von ihr eingeschlossene Volumen zu berechnen. Ist dies geschehen, kann der nächste Würfel eingelesen werden. Ein solcher Fall ist in Abbildung 3.17 (b) dargestellt.

Da die acht Voxel eines solchen von der Oberfläche geschnittenen Würfels gleichzeitig die Eckpunkte der fünf Tetraeder bilden, können diese Tetraeder wiederum, abhängig von der Konfiguration ihrer Eckpunkte, in fünf Klassen eingeteilt werden.

- Der Wert aller vier Tetraedereckpunkte ist kleiner als der Schwellwert: Das Tetraeder liegt komplett außerhalb einer Komponente. Es steuert keinen Beitrag zur Berechnung der Oberfläche bzw. des Volumens bei. Hier ist keine weitere Betrachtung vonnöten, es kann das nächste Tetraeder eingelesen werden. Dieser Fall ist in Abbildung 3.17 (d) dargestellt.
- Der Wert aller vier Tetraedereckpunkte ist größer oder gleich dem Schwellwert: Das Tetraeder liegt komplett innerhalb einer Komponente. Es steuert keinen Beitrag zur Berechnung der Oberfläche, wohl aber zur Berechnung des Volumens bei. Sein Volumen wird zum Gesamtvolumen hinzuaddiert. Danach kann das nächste Tetraeder eingelesen werden. Dieser Fall ist in Abbildung 3.17 (h) dargestellt.
- Der Wert eines einzigen Tetraedereckpunktes ist größer oder gleich dem Schwellwert und der Wert der anderen drei Tetraedereckpunkte ist kleiner als der Schwellwert: Das Tetraeder liegt zum Teil außerhalb und zum Teil innerhalb einer Komponente - es wird von der Komponentenoberfläche geschnitten. Diese Oberfläche - ein Dreieck - muss nun gefunden werden. Dazu wird entlang der drei Kanten zwischen dem Voxel, das sich innerhalb der Komponente, und der drei Voxel, die sich außerhalb der Komponente befinden, die Position des Schwellwertes mittels Interpolation errechnet. Mit Hilfe der drei interpolierten Schnittpunkte wird die Dreiecksfläche berechnet und zur Gesamtoberfläche der Komponente hinzuaddiert. Ebenso muss das Volumen des Tetraeders, das durch die drei gewonnenen Schnittpunkte und den Eckpunkt innerhalb der Komponente definiert ist, zum Gesamtvolumen hinzuaddiert werden. Ist dies geschehen, kann das nächste Tetraeder eingelesen werden. Ein solcher Fall ist in Abbildung 3.17 (e) dargestellt.
- Der Wert eines einzigen Tetraedereckpunktes ist kleiner als der Schwellwert und der Wert der anderen drei Tetraedereckpunkte ist größer oder gleich dem Schwellwert:

Das Tetraeder liegt zum Teil außerhalb und zum Teil innerhalb einer Komponente - es wird von der Komponentenoberfläche geschnitten. Diese Konfiguration ist dem vorher genannten Fall ähnlich, nur wird hier nicht jenes Volumen des Tetraeders zum Gesamtvolumen hinzuaddiert, welches durch die drei Schnittpunkte und den Eckpunkt außerhalb der Komponente beschrieben wird, sondern das Volumen des Ursprungstetraeders abzüglich des Volumens dieses Tetraeders, da es ja außerhalb der Komponente liegt. Ist dies geschehen, kann das nächste Tetraeder eingelesen werden. Ein solcher Fall ist in Abbildung 3.17 (g) dargestellt.

- Der Wert zweier Tetraedereckpunkte ist kleiner als der Schwellwert und der Wert der anderen beiden Tetraedereckpunkte ist größer oder gleich dem Schwellwert: Das Tetraeder liegt zum Teil außerhalb und zum Teil innerhalb einer Komponente - es wird von der Komponentenoberfläche geschnitten. Mittels Interpolation wird an vier Kanten zwischen jeweils zwei Eckpunkten, zwischen denen ein Übergang stattfindet, ein Schnittpunkt berechnet. Die Oberfläche der beiden entstehenden Dreiecke wird zur Gesamtoberfläche hinzuaddiert; auch liefert diese Konfiguration einen Beitrag zum Gesamtvolumen. Dazu wird das Volumen von drei Tetraedern berechnet, welche durch die vier gewonnenen Schnittpunkte und die beiden Eckpunkte innerhalb der Komponente definiert sind. Ist dies geschehen, kann das nächste Tetraeder eingelesen werden. Ein solcher Fall ist in Abbildung 3.17 (f) dargestellt.

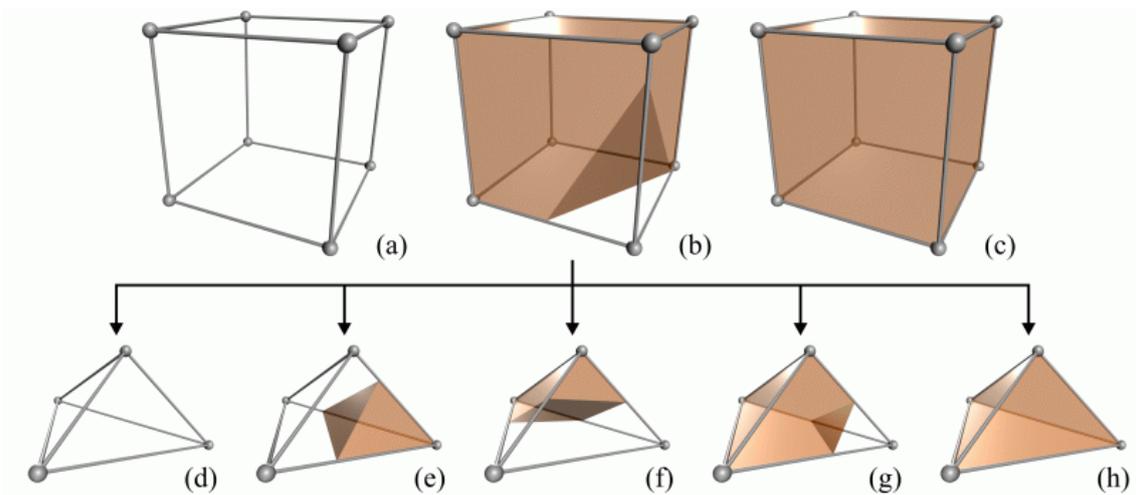


Abbildung 3.17.: Mögliche Konfigurationen von Würfeln und Tetraedern

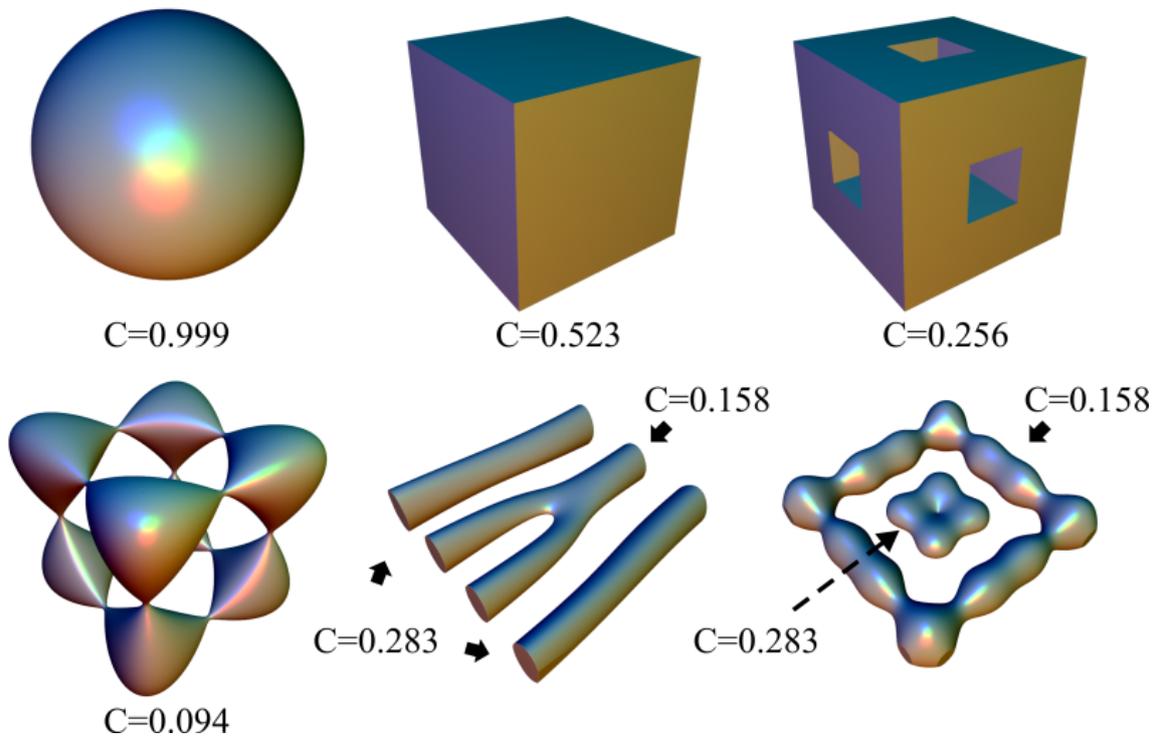


Abbildung 3.18.: Einige Objekte und ihre Kompaktheit

Nachdem alle zu einer Komponente gehörenden $2 \times 2 \times 2$ Würfel überprüft worden sind, kann schließlich die Kompaktheit der Komponente mit der Formel

$$C = \frac{V^2}{36\pi S^3} \quad (3.9)$$

berechnet werden, wobei C die Kompaktheit, V das Gesamtvolumen und S die Gesamtoberfläche der Komponente darstellen. Der Faktor 36π normiert die Kompaktheit auf das Intervall $(0..1]$ und ermöglicht so den einfachen Vergleich zur Kompaktheit einer perfekten Kugel. Abbildung 3.18 zeigt einige ausgewählte Objekte, welche in $250 \times 250 \times 250$ Voxeln abmessenden Volumendatensätzen erzeugt worden sind, und deren Kompaktheit.

3.5.4. Resultate

In Abbildung 3.19 ist die mittels des Marching Tetrahedron Algorithmus generierte Oberfläche des Endothel-datensatzes der Perfusionsserie 09 dargestellt. Das insgesamt betrachtete Gewebevolumen, also das reale Gewebevolumen des Datensatzes beträgt $39297944.13 \mu\text{m}^3$. In ihm sind 227 Vordergrundkomponenten und 2 Hintergrundkomponenten, gezählt vor dem Füllen der Hohlräume mit Objektvoxeln, enthalten. Das von Endothelzellen belegte Volumen beträgt 12.62% des Gesamtvolumens. Die Gesamtoberfläche aller Komponenten liegt bei $878566.64 \mu\text{m}^2$, ihr Gesamtvolumen bei $4959003.15 \mu\text{m}^3$ und ihre durchschnittliche gewichtete Kompaktheit bei 0.0615. Die Gewichtung der Kompaktheit einer Komponente hängt von ihrer Größe ab. Große Komponenten tragen viel, kleine Komponenten wenig zum Ergebnis bei.

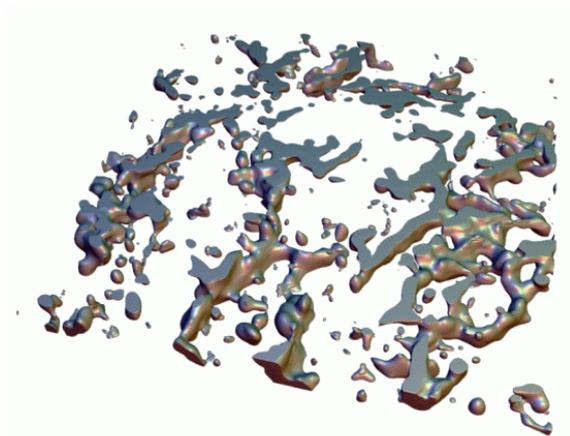


Abbildung 3.19.: Die Oberfläche des Endothel-datensatzes

3.6. Skelettierung

Die Skelettierung ist der gebräuchlichste Vorverarbeitungsschritt bei der Raster-zu-Vektor Umwandlung eines Volumendatensatzes und besteht in der Reduktion des Bildinhaltes auf dessen Skelett [Loh 1998]. Es handelt sich hierbei um eine Art der Erosion, die speziellen Regeln folgt. Als Skelett bezeichnet man die „ein Voxel starke“ Linie [LVG 1980], welche die Struktur des Originalobjektes widerspiegelt - in diesem Fall spricht man von der

so genannten Medialachse. Das Ergebnis einer Skelettierung kann aber auch die Medialfläche eines Objektes sein [GB 1990], die genauere Aufschlüsse über die Richtung der maximalen räumlichen Ausdehnung desselben in Teilen oder als Ganzes liefern kann - diese Art der Skelettierung sei hier jedoch nur am Rande erwähnt. Abbildung 3.20 zeigt ein Objekt (a), dessen Medialfläche (b) und Skelett (c).

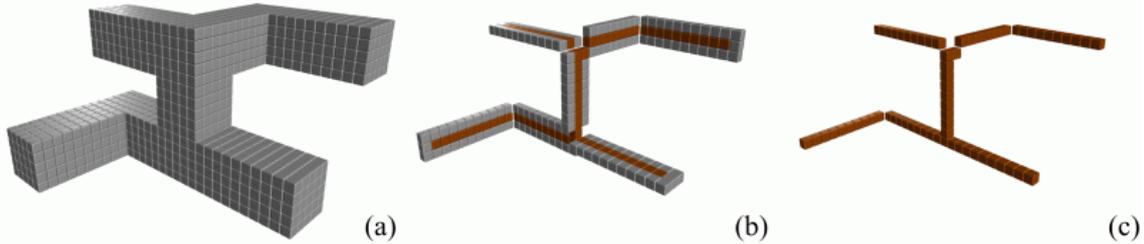


Abbildung 3.20.: Oberfläche, Medialfläche und Medialachse

Das Skelett eines Objektes ist aber nichts Eindeutiges, was aus der Vielfalt der bis heute entwickelten Skelettierungsalgorithmen ersichtlich wird. Erste Ansätze zur Skelettierung stammen aus dem Jahre 1967 von H. Blum [Blu 1967]. Dieser definierte das Skelett als die Position der Mittelpunkte aller maximalen, dem Objekt eingeschriebenen Kreise (2D) bzw. Kugeln (3D). Eine gute bildliche Veranschaulichung liefert dazu die so genannte Präriefeuer-Analogie [PK 1999]: Zündet man eine mit Gras bewachsene Fläche rundherum an, befindet sich an den Stellen, an denen sich die Flammen treffen und aufgrund des bereits aufgebrauchten Brennmaterials gegenseitig auslöschen, das Skelett.

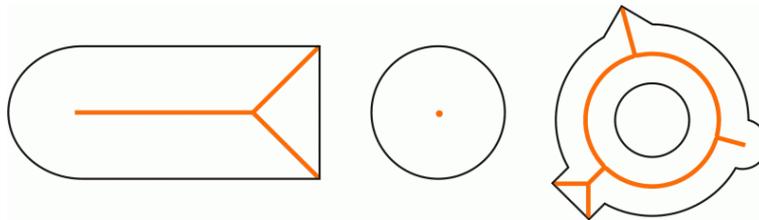


Abbildung 3.21.: Zweidimensionale Objekte mit eingeschriebenem Skelett

In Abbildung 3.21 sind drei zweidimensionale Objekte zusammen mit ihrem Skelett dargestellt. Im Diskreten ist die Skelettierung eine Approximation des wahren Euklidischen Skelettes [PK 1998].

Ausgangspunkt für eine dreidimensionale Skelettierung ist ein binärer Volumendatensatz mit einer oder mehreren verbundenen Komponenten. Die Idee besteht nun darin, so viele Objektvoxel wie möglich aus dem Datensatz zu löschen, d.h. sie in Hintergrundvoxel umzuwandeln, ohne die Topologie der Komponenten zu zerstören und zusätzlich ihre ursprüngliche Form und Position im Raum beizubehalten. Das Resultat dieses Vorganges ist das Skelett des binären Volumendatensatzes.

Der Topologieerhalt steht im Vordergrund eines jeden Skelettierungsalgorithmus. Die Topologie eines Objektes wird durch dessen Eulerzahl beschrieben [Sri 1981]. Diese ist eine Kombination dreier topologischer Merkmale: der Anzahl der verbundenen Komponenten K , der Anzahl der Hohlräume H und der Anzahl der Tunnel (dem Genus) T des Objektes. Die Eulerzahl E berechnet sich mittels

$$E = K + H - T. \quad (3.10)$$

Verbundene Komponenten sind zusammenhängende Strukturen, die aus Objektvoxeln bestehen. Ein Hohlraum ist eine komplett von Objektvoxeln eingeschlossene Hintergrundkomponente und ein Tunnel kann als Loch in einer Komponente beschrieben werden. Die Eulerzahl ist somit ein globales Merkmal eines Objektes und zwei Objekte sind folglich topologisch äquivalent, wenn sie die selbe Eulerzahl besitzen.

Soll die Topologie im Verlauf der Berechnung des Skelettes erhalten bleiben, darf das Löschen von Objektvoxeln weder zusammenhängende Objektkomponenten voneinander trennen, noch nicht zusammenhängende Objektkomponenten verbinden. Genauso dürfen Hohlräume nicht gefüllt oder erzeugt, Tunnel nicht geschlossen oder erzeugt, Hohlräume nicht miteinander verbunden bzw. Objekte gelöscht werden.

Der Erhalt der Topologie geht zwar in gewisser Weise mit dem Erhalt der Form einher, jedoch reicht die Topologie allein noch nicht aus, um die geometrischen Eigenschaften eines Objektes zu charakterisieren und zu erhalten [MS 1996]. Wie bereits erwähnt, sind zwei Objekte mit derselben Eulerzahl topologisch äquivalent. Jedes Objekt, welches aus einer weit verzweigten zusammenhängenden Komponente besteht und weder Hohlräume noch Tunnel aufweist, würde im Verlauf der Skelettierung auf ein einzelnes Voxel reduziert werden, da solch ein Objekt und ein einziges Voxel dieselbe Eulerzahl besitzen. An dieser Stelle wird ersichtlich, dass man für den Erhalt der Geometrie weitere Regeln benötigt. Generell sollten Skelettierungsalgorithmen vier Forderungen zugrunde liegen:

- Erstens muss das Skelett die Topologie eines Objektes widerspiegeln - das ist der bereits beschriebene Topologieerhalt.

- An zweiter Stelle steht der Erhalt der Form. Wesentliche Eigenschaften des Objektes müssen sich im Skelett wiederfinden. Ein Objekt wie zum Beispiel ein „d“ darf nicht zu einem „o“ skelettisiert werden - das Skelett soll nicht mit dem topologischen Kern [BA 1994] identisch sein, da die Skelettisierung einer Schrumpfung des Objektes nicht gleichkommt.
- Drittens muss sich das Skelett an der geometrisch korrekten Position, nämlich der Mitte der Objekte, befinden - eine Skelettisierung sollte also in alle Raumrichtung gleichmäßig erfolgen.
- An vierter Stelle steht das Erzeugen des maximalen Skelettes. Damit ist die gewünschte Stärke des Skelettes von einem Voxel gemeint.

Die Realisierung dieser vier Ziele ist auf vielerlei Art und Weise möglich, was die Existenz der vielen Skelettisierungsalgorithmen erklärt. Eine weitere Möglichkeit, eine Skelettisierung durchzuführen, eröffnet die Euklidische Distanztransformation [Bor 1984]. Dieses Verfahren liefert zwar geometrisch korrekte Resultate, garantiert aber den Topologieerhalt nicht. Es kann jedoch mit anderen topologieerhaltenden Skelettisierungsalgorithmen kombiniert werden [ST 1995], um bessere Ergebnisse zu erzielen.

Skelettisierung ist nicht umkehrbar, d.h. es ist nicht möglich, das ursprüngliche Objekt aus dem Skelett heraus zu rekonstruieren. Die Informationen über das ursprüngliche Objekt sind im Verlauf der Skelettisierung verlorengegangen. Zu erwähnen ist ebenfalls noch die Sensibilität aller Skelettisierungsalgorithmen bezüglich der räumlichen Ausrichtung der zu skelettisierenden Objekte - Skelettisierung ist nicht rotationsinvariant.

Alle Voxel eines Volumendatensatzes, die gelöscht werden dürfen, ohne dass sich die Topologie eines Objektes ändert, werden als Simple Points bezeichnet [BM 1992]. Ein Skelettisierungsalgorithmus ist also nichts anderes, als ein Prozess, der Simple Points löscht. Dieses Löschen geschieht in nacheinander abfolgenden Iterationsschritten. Abbildung 3.22 zeigt zwei Beispiele für Non-Simple Points (a) und (b) und ein Beispiel für einen Simple Point (c).

Im Rahmen der Skelettisierung ist es im Hinblick auf Rechenzeit und Genauigkeit wenig sinnvoll, bei der Überprüfung jedes einzelnen Voxels auf Löschbarkeit die Eulerzahl des gesamten Volumendatensatzes zu berechnen, um festzustellen ob sich die Topologie

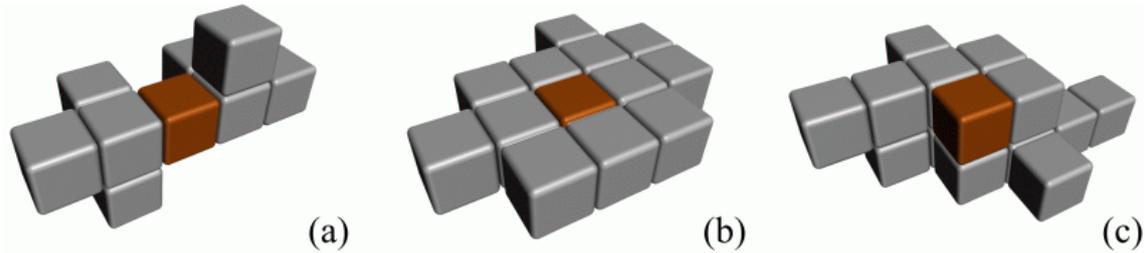


Abbildung 3.22.: Non-Simple Points (a) und (b) und Simple Point (c)

ändert. Es wird also ein lokales Kriterium benötigt, das in einer kleinen Nachbarschaft um das betrachtete Voxel herum eine Überprüfung auf Topologieerhalt durchführt [Loh 1998]. Der Nachteil bei einer lokalen Betrachtung besteht jedoch darin, dass die Kantenschärfe von Objekten nicht erhalten bleibt. Im Folgenden sollen zunächst einige Grundlagen geschaffen werden, damit später ein solches lokales Kriterium eingeführt werden kann.

3.6.1. Grundlagen

Ein Simple Point ist, wie bereits erwähnt, ein Voxel, welches aus dem Volumendatensatz gelöscht werden kann, ohne dass sich die Topologie des ihm zugehörigen Objektes bzw. dessen Eulerzahl ändert.

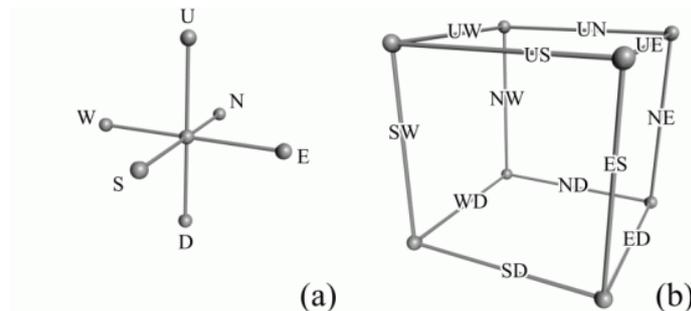


Abbildung 3.23.: Die Richtungen bei der Skelettierung

Dies ist nur bei den Voxeln der Fall, die sich auf der Oberfläche einer Komponente befinden und nicht Teil einer „ein Voxel starken“ Linie bzw. einer „ein Voxel flachen“ Kom-

ponente sind. Solch löschrare Oberflächenvoxel werden auch als Bordervoxel bezeichnet [PK 1998].

Bordervoxel kann man noch genauer unterteilen. Diese Unterteilung ist abhängig von der Lage der Bordervoxel auf der Oberfläche eines Objektes, genauer gesagt von der Richtung in welche sie „zeigen“. Abhängig von der Feinheit der Unterscheidung gibt es hierbei entweder sechs oder zwölf verschiedene Typen von Bordervoxeln, je nachdem ob man sich nur an den Hauptrichtungen (North, South, West, East, Up, Down) orientiert oder eine Kombination aus selbigen wählt (North-Up, North-Down, North-West, North-East, South-Up usw.). Die verschiedenen Richtungen sind in der Abbildung 3.23 dargestellt. Im Hinblick auf die geometrische Ähnlichkeit zwischen ursprünglichem Objekt und entstandenem Skelett soll abschließend noch das Linienendvoxel genannt werden [MS 1996]. In dessen 26er Nachbarschaft befindet sich nur ein einziges Objektvoxel, es bildet somit das Ende einer Linie. Ein Linienendvoxel ist ebenso ein Bordervoxel. Dieses dürfte auch wegen Gleichheit von Bordervoxeln und Simple Points gelöscht werden. Zugunsten des Geometrieerhaltes werden Linienendvoxel jedoch immer gesondert behandelt - sie werden nie gelöscht. Dies verhindert, dass ein Objekt ohne Hohlräume und Tunnel im Verlauf der Skelettierung auf ein einziges, aber topologisch äquivalentes, Voxel reduziert wird und ermöglicht die Bildung von nicht geschlossenen Linien als Bestandteil eines Skelettes. Abbildung 3.24 zeigt eine Linie mit zwei Linienendvoxeln.

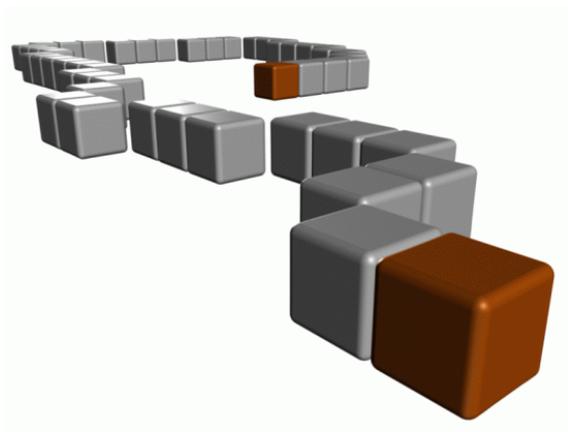


Abbildung 3.24.: Das Linienendvoxel

3.6.2. Skelettierungsalgorithmen

Die Gemeinsamkeit und das eigentliche Ziel aller Skelettierungsalgorithmen besteht im sukzessiven Löschen von Simple Points, solange, bis keine mehr gelöscht werden können. Je nach Algorithmus müssen diese Simple Points zusätzlich einige Nebenbedingungen erfüllen, damit die geometrischen Eigenschaften des Ursprungsbildes erhalten bleiben. Die verschiedenen Skelettierungsalgorithmen unterscheiden sich in der Reihenfolge, in der Bordervoxel als löscher bezeichnet werden und in der jeweiligen Formulierung der Nebenbedingungen. Abbildung 3.25 zeigt ein Objekt, welches nur aus Simple Points besteht - löschte man alle simultan, würde das Objekt gänzlich verschwinden. Das Entfernen der Simple Points muss also in irgendeiner Form geordnet ablaufen, damit solche Fehler vermieden werden. Grundsätzlich gibt es hierfür zwei Strategien, an denen man sich beim Entwurf eines Skelettierungsalgorithmus orientieren kann.

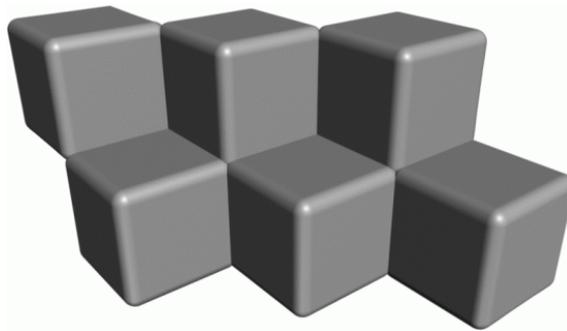


Abbildung 3.25.: Aus Simple Points bestehendes Objekt

Die eine Variante besteht darin, Simple Points nicht simultan zu löschen, sondern ein Voxel nach dem anderen zu entfernen. Algorithmen, die sich dieses Verfahrens bedienen, bezeichnet man als sequentiell [MS 1996]. Der Vorteil sequentieller Skelettierungsalgorithmen liegt darin, dass die Topologie von Objekten erhalten bleibt. In punkto Geometrieerhalt ist man natürlich auf die Einhaltung von Nebenbedingungen angewiesen - Objekte, die gänzlich aus Simple Points bestehen, können zwar nicht verschwinden, jedoch würden alle Voxel bis auf ein einziges gelöscht. Eine zusätzliche Überprüfung der Simple Points auf Linienendvoxel kann dieses Problem beseitigen.

Die zweite Variante beinhaltet das simultane, jedoch auf gar keinen Fall wahllose, Löschen vieler Simple Points zur selben Zeit. Algorithmen, die auf diesem Prinzip beruhen,

heißen parallel [MS 1996]. Sie können aber auch die Topologie zerstören, wenn keine zusätzlichen Absicherungen getroffen werden. Parallele Skelettierungsalgorithmen kann man aufgrund des Ablaufes in den Iterationsschritten in drei Klassen unterteilen.

Die erste Klasse bilden solche Algorithmen, die einen Iterationsschritt nicht in Subiterationen unterteilen - auch als Fully Parallel bezeichnet [MS 1996]. Der Skelettierungsalgorithmus wird hierbei pro Iterationsschritt nur einmal auf alle Objektvoxel gleichzeitig angewandt. Um den Topologieerhalt zu garantieren, werden zum Löschen eines Objektvoxels auch Voxel untersucht, die sich in dessen $5 \times 5 \times 5$ Nachbarschaft und nicht in seiner $3 \times 3 \times 3$ Nachbarschaft befinden.

Die zweite Klasse beinhaltet Algorithmen, die einen Iterationsschritt in eine bestimmte Anzahl von Subiterationen unterteilen - sie werden als Directional bzw. Border Sequential bezeichnet [PK 1998]. Hier wird nur die $3 \times 3 \times 3$ Nachbarschaft der Objektvoxel untersucht. In jeder Subiteration können nur Simple Points eines bestimmten Typs entfernt werden, das Löschen dieser Voxel erfolgt parallel. Abhängig von der Anzahl der verschiedenen Richtungen, nach denen man die Simple Points einteilt, gibt es Skelettierungsalgorithmen, die sechs oder gar zwölf Subiterationen pro Iterationsschritt ausführen. Damit das resultierende Skelett keine Ortsveränderung erfährt, ist es notwendig, die Reihenfolge der einzelnen Richtungen vorher genau festzulegen und während der Skelettierung beizubehalten.

Algorithmen, die den Bildraum in disjunkte Felder aufteilen, gehören in die dritte Klasse paralleler Skelettierungsalgorithmen - auch Subfield Sequential genannt [PK 1998]. In jedem Iterationsschritt werden jeweils andere Unterbereiche aktiviert und dort findet dann die Skelettierung statt. Typischerweise nutzt man acht Unterbereiche, damit die Topologie erhalten bleibt. Der Nachteil solcher Algorithmen liegt jedoch darin, dass sie aufgrund der Aufteilung des Volumens in mehrere Teilbereiche nicht translationsinvariant sind.

Um herauszufinden, ob ein Voxel gelöscht werden kann, wird überprüft, ob es ein Simple Point ist. Es gibt aber noch eine weitere Möglichkeit zu bestimmen, welche Voxel entfernt werden dürfen. Hierzu erzeugt man im Voraus $3 \times 3 \times 3$ Voxel abmessende Masken, so genannte Templates [MS 1996]. Diese vorgefertigten Templates beinhalten verschiedene Konfigurationen von Objekt- und Hintergrundvoxeln. Beim Skelettieren wird also nicht für jedes Voxel bestimmt, ob es ein Simple Point ist, man überprüft lediglich, ob die Maske auf das Voxel und dessen $3 \times 3 \times 3$ Nachbarschaft passt (Template Matching). Ist dies der Fall, kann es gelöscht werden. Die Erarbeitung solcher Templates ist jedoch kompliziert, da von ihnen die Qualität bzw. geometrische Genauigkeit des entstehenden Skelettes abhängt. Die Anzahl der benötigten Templates hängt von der Art des jeweiligen Skelettierungsalgorithmus ab. Allerdings lässt sich die Menge aller Templates auf eine

kleine Anzahl von Basistemplates reduzieren. Mittels Symmetrieeoperationen (Drehung und Spiegelung) können aus diesen wiederum alle Templates erzeugt werden. Templates sind also nichts anderes als Löschbedingungen in einer anderen Form. Im Folgenden sei nun eine kleine Auswahl verschiedenster Skelettierungsalgorithmen vorgestellt.

Three-Dimensional Skeletonization: Principle and Algorithm [LVG 1980]

Dieser Skelettierungsalgorithmus aus dem Jahre 1980 ist sequentieller Natur. Die Überprüfung, ob ein Voxel ein Simple Point ist oder nicht, findet in dessen $3 \times 3 \times 3$ Nachbarschaft statt. Diese wird hierbei in acht $2 \times 2 \times 2$ Würfel unterteilt, in welchen Teilüberprüfungen erfolgen. Jeder Würfel liefert also einen Beitrag zum Gesamtergebnis und für jedes Voxel finden insgesamt 16 Teilüberprüfungen, acht mit und acht ohne das aktuell betrachtete Voxel, statt. Ziel dieser Prozedur ist ein Vorher-Nachher-Vergleich. Handelt es sich bei dem aktuellen Voxel um einen Simple Point, müssen beide Ergebnisse übereinstimmen: Die Eulerzahl hat sich nicht verändert und folglich ändert sich beim Löschen des Voxels auch die Topologie nicht. Stimmen beide Ergebnisse nicht überein, darf das Voxel nicht gelöscht werden. Wie die Berechnung erfolgt, sei nun kurz umrissen.

Die Bitwerte an den einzelnen Positionen innerhalb der $2 \times 2 \times 2$ Würfel entsprechen $2^8 = 256$ möglichen Belegungen mit 0 oder 1. Jeder Würfelkonfiguration ist eine bestimmte Binärzahl und somit auch eine Dezimalzahl zugehörig. Binär- und entsprechende Dezimalzahlen sind in einer Tabelle gespeichert. Der jeweilige Beitrag einer Konfiguration zum Gesamtergebnis wird berechnet und ebenfalls in die Tabelle geschrieben, er ist abhängig von der Anzahl der freiliegenden Ecken, Kanten und Flächen der Voxel innerhalb des $2 \times 2 \times 2$ Würfels. Diese Tabelle kann im Voraus berechnet werden und besitzt aufgrund von Symmetrieeigenschaften der Würfel nicht 256 sondern nur 22 Einträge. Für jede Würfelkonfiguration wird der entsprechende Beitrag des Würfels einfach aus der Tabelle abgelesen.

Mit diesem Algorithmus können sowohl 6- als auch 26-adjazente Objekte skelettiert werden. Der Beitrag einer Konfiguration im 26-adjazenten Fall entspricht dem Beitrag der bitweise komplementären Konfiguration im 6-adjazenten Fall.

Dieser Skelettierungsalgorithmus lieferte bei seiner Implementierung für einige Konfigurationen Werte, die in der Tabelle der Originalveröffentlichung nicht vorkamen - es wurden Voxel gelöscht, die nicht hätten gelöscht werden dürfen. Somit ist dieser Skelettierungsalgorithmus für unsere Arbeit ungeeignet.

A Parallel Thinning Algorithm for 3-D Pictures [TF 1981]

Dieser Algorithmus stammt aus dem Jahre 1981. Es handelt sich dabei um einen parallelen Skelettierungsalgorithmus, der aus den Objekten im ersten Schritt Medialflächen erzeugt und diese in einem weiteren Durchlauf zu Medialachsen skelettieren kann - ist man lediglich an Medialflächen interessiert, erspart man sich einfach den zweiten Schritt. Jeder Iterationsschritt unterteilt sich in sechs Subiterationen, die jeweils Simple Points einer der sechs Hauptrichtungen löschen. Die Abfolge der Richtungen, nach denen Simple Points gelöscht werden ist N, S, W, E, U, D. Für jedes Objektvoxel wird die $3 \times 3 \times 3$ Nachbarschaft untersucht. Ein Objektvoxel darf gelöscht werden, wenn es zwei Bedingungen erfüllt:

- Es muss ein Simple Point sein und mindestens zwei weitere Objektvoxel in seiner 26er Nachbarschaft besitzen.
- Für das Voxel $p(i, j, k)$ definiert man drei Prüfebene $x = i$, $y = j$, und $k = z$. Hierbei besteht die Prüfebene $x = i$ aus allen Voxeln, deren x-Koordinate den Wert i hat. Analog werden $y = j$ und $z = k$ definiert. Ein Simple Point $p(i, j, k)$ des Typs N oder S darf gelöscht werden, wenn er in den Prüfebene $z = k$ und $y = j$ löscher ist. Ein Simple Point des Typs E oder W darf gelöscht werden, wenn er in den Prüfebene $x = i$ und $z = k$ löscher ist. Ein Simple Point des Typs U oder D darf gelöscht werden, wenn er in den Prüfebene $y = j$ und $x = i$ löscher ist. Ein Voxel ist in einer Prüfebene löscher, wenn durch sein Löschen die restlichen Objektvoxel im 3×3 Fenster auf dieser Ebene nicht voneinander getrennt werden und mindestens zwei weitere Objektvoxel in diesem 3×3 Fenster existieren.

Das Ergebnis dieses ersten Durchlaufes sind Medialflächen. Wendet man den Skelettierungsalgorithmus ein weiteres Mal auf diese Medialflächen an, werden Medialachsen erzeugt. Hierbei ist eine Änderung der zweiten Löscherbedingung notwendig. Waren bisher mindestens zwei weitere Objektvoxel im 3×3 Fenster auf der Prüfebene vonnöten, damit ein Objektvoxel gelöscht werden konnte, so reicht jetzt bereits ein weiteres Objektvoxel aus. Dieses muss sich aber entgegen der in der Subiteration aktuellen Richtung befinden. Zur Berechnung der Medialachsen ist der Umweg über die Berechnung der Medialflächen insofern ungeeignet, als dass die Lage der Medialachsen von den zuvor berechneten Medialflächen beeinflusst wird. Da die aus organischen Strukturen im ersten Schritt extrahierten Medialflächen innerhalb größerer Volumenbereiche in den seltensten Fällen die eigentlichen Medialachsen enthalten, liefert dieser Skelettierungsalgorithmus ein für unsere Arbeit zu stark von den eigentlichen Medialachsen verschiedenes Skelett.

A Fully Parallel Thinning Algorithm and Its Application [MS 1996]

1996 wurde dieser Skelettierungsalgorithmus vorgestellt. Es handelt sich um einen Fully Parallel Algorithmus, der auf Template Matching basiert. Die Templates haben eine Größe von $3 \times 3 \times 3$ Voxeln, beinhalten teilweise aber auch zusätzliche Voxel aus der $5 \times 5 \times 5$ und der $7 \times 7 \times 7$ Nachbarschaft. Insgesamt werden die Templates in 4 Klassen unterteilt:

- 6 Klasse A Templates zum Löschen von Objektvoxeln (6-adjazent, auf Flächen) in den 6 Hauptrichtungen (N, S, W, E, U, D)
- 12 Klasse B Templates zum Löschen von Objektvoxeln (6-adjazent, auf Kanten) in den 12 Nebenrichtungen (NW, NE, usw.)
- 8 Klasse C Templates zum Löschen von Objektvoxeln (6-adjazent, auf Ecken) in zusätzlichen 8 Richtungen (SED, NED, usw.)
- 12 Klasse D Templates zum Löschen von Objektvoxeln (26-adjazent) in weiteren 12 Richtungen (SW, NE, usw.)

Einige Richtungen tauchen mehrfach auf. Dies hängt mit unterschiedlichen Belegungen der entsprechenden Templates zusammen, die somit alle möglichen Konfigurationen im Volumendatensatz abdecken.

Der Skelettierungsalgorithmus wird pro Iteration auf alle Objektvoxel im Datensatz angewandt. Ein Objektvoxel wird gelöscht, wenn es kein Linienendvoxel ist und mindestens ein Template der Klasse A, B, C oder D auf seine Umgebung passt. In einer Erweiterung des Algorithmus werden vorher alle Objektvoxel, die 26-adjazent zu einem Hintergrundvoxel sind (alle Hüllenvoxel), markiert und danach auf Löschbarkeit überprüft. Insgesamt müssen also weniger Berechnungen durchgeführt werden, was eine Zeitersparnis mit sich bringt.

Im Originalquellcode der Verfasser werden vor dem Beginn der Skelettierung zwei Dilatationen des binären Volumendatensatzes durchgeführt. Erst dieser Vorverarbeitungsschritt stellt sicher, dass der Algorithmus ein korrektes Ergebnis liefert. In unserer Arbeit darf eine Dilatation der Datensätze vor der Skelettierung nicht durchgeführt werden, da das Resultat des gekoppelten anisotropen nichtlinearen Reaktionsdiffusionssystems im Hinblick auf den Erhalt feiner Gewebestrukturen zunichte gemacht werden würde und sich darüber hinaus die Anzahl der Objektkomponenten in einem Volumendatensatz ändern kann. Somit ist dieser Ansatz für unsere Arbeit ungeeignet.

A Parallel 3D 12-Subiteration Thinning Algorithm [PK 1999]

Dieser Skelettierungsalgorithmus ist der Nachfolger des „A 3D 6-subiteration thinning algorithm for extracting medial lines“ [PK 1998] und stammt aus dem Jahre 1999. Wie der Name schon sagt, handelt es sich um einen parallelen Skelettierungsalgorithmus mit 12 Subiterationen pro Iterationsschritt. Der Algorithmus basiert auf Template Matching, wobei die Templates $3 \times 3 \times 3$ Voxel abmessen. Insgesamt gibt es 168 Templates (14 pro Subiteration), die sich aufgrund von Symmetrieoperationen auf neun Basistemplates reduzieren lassen. Die Reihenfolge der Subiterationen garantiert ein mittig liegendes Skelett und lautet US, NE, WD, ES, UW, ND, SW, UN, ED, NW, UE, SD - jede andere Sequenz resultiert in einem anderen Skelettierungsalgorithmus. Lässt man bei der Skelettierung einige Templates ungenutzt, erzeugt der Algorithmus Medialflächen anstatt Medialachsen. Der Nachteil dieses Algorithmus, und zugleich der Grund warum er in unserer Arbeit keine Verwendung findet, ist das Aussehen der entstandenen Skelette. Der Algorithmus scheint recht anfällig gegenüber Rauschen auf der Oberfläche von zu skelettierenden Objekten zu sein und liefert dadurch „bärtige“ Skelette, d.h. Skelette mit vielen Kreuzungen, von denen sehr kurze Äste ausgehen.

3.6.3. TopoSkel

Für die Skelettierung der im EndothelDatensatz vorliegenden kapillaren Strukturen ist als Ergebnis ein sehr glattes Skelett erwünscht, um später möglichst sinnvolle Angaben über die Länge der Kapillaren und Anzahl der Kreuzungen machen zu können. In diesem glatten Skelett müssen sich selbstverständlich an den Stellen Kreuzungen befinden, an welchen Kapillarfortsätze von größeren kapillaren Strukturen abgehen. Kleinere Unebenheiten auf der Kapillaroberfläche dürfen jedoch nicht zur Bildung von zusätzlichen Kreuzungen führen. Die zu skelettierenden Strukturen haben einen annähernd runden bzw. ovalen Querschnitt, sind untereinander vernetzt und liegen unausgerichtet im Volumen. An den Volumengrenzen ist die Oberfläche der Kapillaren vollkommen flach, da das betrachtete Volumen nur einen Ausschnitt des gesamten Gewebevolumens darstellt. Keine dieser Eigenschaften der kapillaren Strukturen darf sich negativ auf das Ergebnis des Skelettierungsalgorithmus auswirken. Desweiteren haben die Volumendatensätze unterschiedliche Auflösungen in den einzelnen Dimensionen. Das liegt darin begründet, dass die Abstände der optischen Schnittebenen anders sind als die Abstände der lokalen Detektionen in einer solchen Schnittebene. Diese anisotrope Auflösung soll bei der Skelettierung berücksichtigt werden.

Aufgrund der speziellen Anforderungen an das Ergebnis der Skelettierung liefern die zuvor kurz beschriebenen Algorithmen für unsere Zwecke keine befriedigenden Ergebnisse. Folglich wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein neuer Skelettierungsalgorithmus **TopoSkel** (Topologieerhaltende Skelettierung) entwickelt, der für die Zielstellung der Arbeit am geeignetsten erscheint.

Es handelt sich dabei um einen sequentiellen Skelettierungsalgorithmus, bei welchem die Gewährleistung des Topologieerhaltes auf dem Simple Point Kriterium von Ma und Sonka [MS 1996] basiert und der Erhalt der Form der Strukturen durch die Nutzung des Linienendvoxel-Kriteriums sichergestellt wird. Das von **TopoSkel** erzeugte Skelett eines Objektes ist maximal und befindet sich an der geometrisch korrekten Position, der Mitte des Objektes.

Die Reihenfolge, nach der die Überprüfung der Voxel auf Simple Points stattfindet, wird durch einen so genannten Nachbarschaftswert gesteuert. Die Nutzung dieses Nachbarschaftswertes und der Kriterien von Simple Point und Linienendvoxel als Grundlage unseres Skelettierungsalgorithmus resultiert in der Erzeugung von Skeletten, welche die zuvor genannten Eigenheiten der Endothelstrukturen berücksichtigen. Im Folgenden ist die Funktionsweise des Algorithmus aufgezeigt.

Simple Point

Das Simple Point Kriterium sorgt für den Topologieerhalt. Ein Objektvoxel darf nur dann gelöscht werden, wenn es ein Simple Point ist.

Sei x ein Objektvoxel eines 3D-Bildes und $N(x)$ seine 26-Nachbarschaft. Laut Ma und Sonka [MS 1996] ist x ein Simple Point, wenn:

- x ist 26-adjazent zu genau einer Objektkomponente in $N(x) - \{x\}$ und
- x ist 6-adjazent zu genau einer Hintergrundkomponente in x 's 18-Nachbarschaft.

Algorithmus

Bevor die eigentliche Skelettierung durchgeführt werden kann, sind noch einige Vorarbeiten vonnöten. Damit bei der Behandlung von Voxeln an den Grenzen des Volumens keine Probleme auftreten, wird dem Datensatz ein zwei Voxel breiter Rand aus Hintergrundvoxeln hinzugefügt. Desweiteren empfiehlt es sich, die in den Objektkomponenten

vorhandenen Hohlräume mit Objektvoxeln auszufüllen. Diese Hohlräume würden im Verlauf der Skelettierung wachsen und unerwünschte „Blasen“ im Skelett erzeugen, da sie topologisch äquivalent zu einer Hohlkugel sind.

Wie bereits erwähnt, ist das Besondere am Skelettierungsalgorithmus **TopoSkel** die Verwendung des Nachbarschaftswertes. Dieser wird zunächst für alle Objektvoxel des Volumendatensatzes, basierend auf der Anzahl von Objektvoxeln in deren kompletter 26er Nachbarschaft, errechnet:

- Für jedes Objektvoxel, welches mit dem aktuell betrachteten Voxel eine Fläche teilt (bis zu 6 Nachbarn), wird die Zahl 100 hinzuaddiert.
- Für jedes Objektvoxel, welches mit dem aktuell betrachteten Voxel eine Kante teilt (bis zu 12 Nachbarn), wird die Zahl 71 hinzuaddiert.
- Für jedes Objektvoxel, welches mit dem aktuell betrachteten Voxel eine Ecke teilt (bis zu 8 Nachbarn), wird die Zahl 58 hinzuaddiert.

Ein Objektvoxel, dessen 26 Nachbarn Objektvoxel sind, erhält demzufolge den Nachbarschaftswert 1916 ($6 * 100 + 12 * 71 + 8 * 58$). Es befindet sich innerhalb einer Objektkomponente, da es keinen Kontakt zum Hintergrund hat. Die Werte sind nicht willkürlich gewählt, sondern vom Euklidischen Abstand der Voxel untereinander abgeleitet. Die Idee hinter diesem Vorgehen besteht darin, dass Voxel, die einen niedrigen Nachbarschaftswert haben, sich nicht so tief in einer Objektkomponente befinden bzw. mehr Kontakt zum Hintergrund haben, als solche mit einem hohen Nachbarschaftswert. Der Nachbarschaftswert gibt später die Reihenfolge vor, in der die Objektvoxel geprüft und gelöscht werden. Sind diese Vorarbeiten erledigt, kann die Skelettierung erfolgen.

Bei der Skelettierung wird jede Objektkomponente separat betrachtet. Dieses Vorgehen spart Rechenzeit, da so weniger Voxel sortiert werden müssen, ohne dass sich am Ergebnis etwas ändert.

Zu Beginn der Skelettierung einer Objektkomponente werden einige ihrer Voxel markiert, in ein Feld eingetragen und dem Nachbarschaftswert nach aufsteigend stabil mittels Mergesort sortiert. Bei diesen markierten Objektvoxeln handelt es sich um Bordervoxel. Es gibt drei Möglichkeiten, welche Arten von Bordervoxeln betrachtet werden:

- Bordervoxel, die nach oben (U) oder unten (D) zu einem Hintergrundvoxel 6-adjazent sind oder
- Bordervoxel, die nach vorn (N) oder hinten (S) zu einem Hintergrundvoxel 6-adjazent sind oder

- Bordervoxel, die nach rechts (E) oder links (W) zu einem Hintergrundvoxel 6-adjazent sind.

Um ein, der anisotropen Auflösung des Datensatzes angepasstes Skelett zu erhalten, hängt die Auswahl der auf Löscharkeit zu überprüfenden Objektvoxel von der Voxelabmessung in der jeweiligen Richtung ab. Für alle drei Raumrichtungen wird jeweils ein Zähler mit der Voxelabmessung initialisiert. Diese Zähler steuern die Reihenfolge, in welcher die Richtungen betrachtet werden. Die aktuelle Richtung ist dabei immer diejenige, deren Zähler den niedrigsten Wert besitzt. Danach wird die jeweilige Voxelabmessung zum betreffenden Zähler hinzuaddiert. Im isotropen Fall bedeutet dies, dass die Abfolge der drei Raumrichtungen, in denen eine Überprüfung von Objektvoxeln auf Löscharkeit stattfindet, immer dieselbe ist.

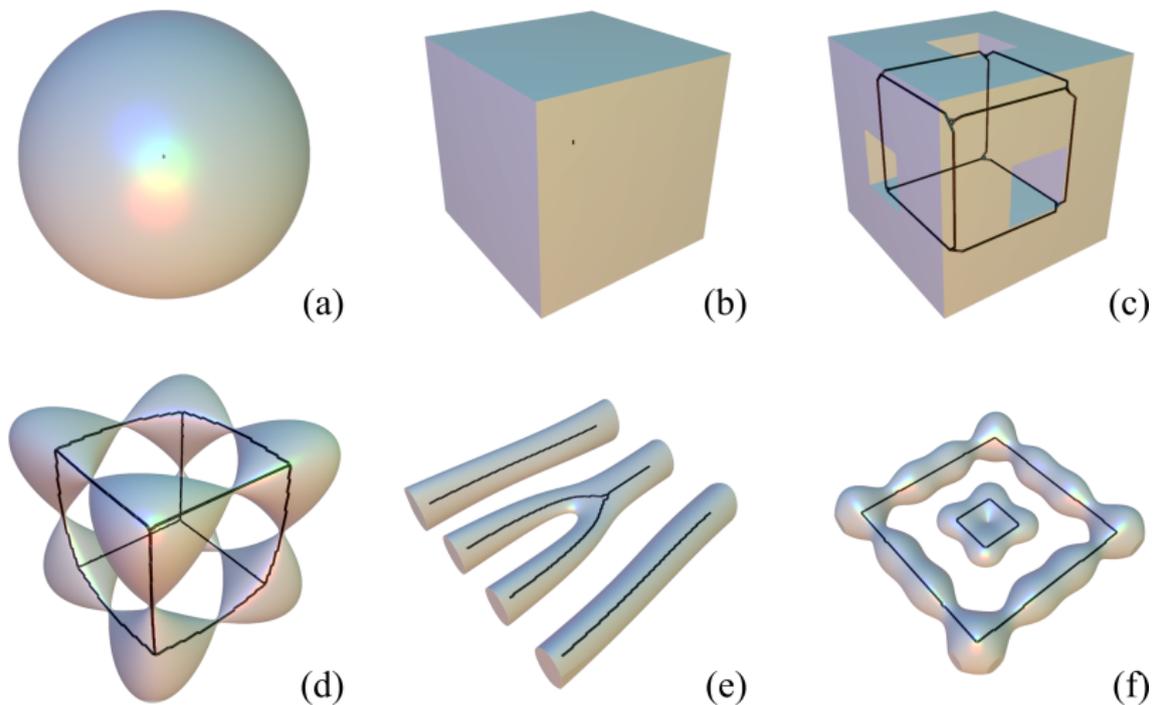


Abbildung 3.26.: Einige Körper und deren mit TopoSkel erzeugtes Skelett

Nacheinander und mit dem kleinsten Nachbarschaftswert beginnend, wird nun für alle markierten Objektvoxel mit gleichem Nachbarschaftswert überprüft, ob es sich bei ihnen

um Simple Points handelt, die keine Linienendvoxel sind. Ist dem so, kann das aktuell betrachtete Objektvoxel gelöscht werden, und es erfolgt eine Aktualisierung der Nachbarschaftswerte benachbarter Objektvoxel. Wurden alle Objektvoxel mit identischem Nachbarschaftswert überprüft und mindestens eines dabei gelöscht, werden die verbleibenden Objektvoxel wieder den Nachbarschaftswerten nach sortiert und vom kleinsten Nachbarschaftswert aus neu geprüft. Konnte bei der Überprüfung eines Nachbarschaftswertes kein Objektvoxel gelöscht werden, findet die Überprüfung der Objektvoxel mit dem nächst höheren Nachbarschaftswert statt. Sind alle Objektvoxel des Feldes überprüft worden, ohne dass nach dem Sortieren ein Objektvoxel gelöscht werden konnte, ist dieser Teilschritt beendet. Die Richtungszähler bestimmen nun die nächste Teilmenge von Bordervoxeln, welche markiert und auf Löscharkeit überprüft werden.

Eine Objektkomponente ist fertig skelettiert, wenn in keiner der drei betrachteten Richtungen Voxel gelöscht werden konnten. Sind alle Objektkomponenten bearbeitet und fertig skelettiert, terminiert der Algorithmus. Das Ergebnis ist das Skelett des ursprünglichen Volumendatensatzes. Abbildung 3.26 zeigt einige ausgewählte Objekte und deren, unter Verwendung von **TopoSkel** erzeugtes Skelett.

Der Skelettierungsalgorithmus verdünnt bei isotroper Auflösung des Volumendatensatzes die Objektkomponenten aus allen sechs Hauptrichtungen (U, D, N, S, W, E) gleichmäßig, passt jedoch im anisotropen Fall das Skelett den Abmessungen der Voxel an. Seine Wirkungsweise ermöglicht das Erzeugen eines Skelettes aus einem Volumendatensatz, welches der räumlichen Konfiguration des dem Datensatz zugrunde liegenden Gewebevolumentensatzes entspricht. Das gleichzeitige Bearbeiten von gegenüberliegenden Seiten verbessert das Ergebnis insofern, als dass sich das resultierende Skelett tatsächlich an der geometrisch korrekten Position, der Mitte der Objektkomponenten, befindet.

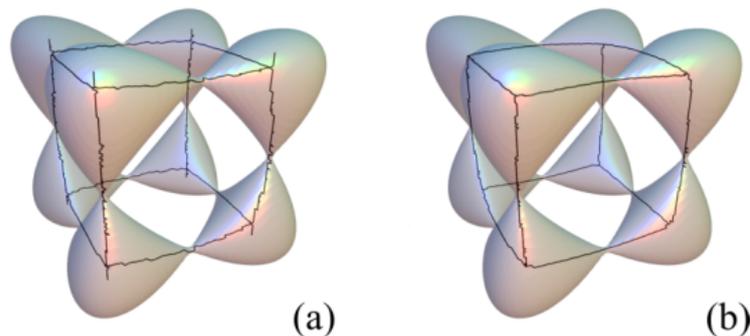


Abbildung 3.27.: Isotrope (a) und anisotrope (b) Skelettierung

In Abbildung 3.27 ist der Vorteil der anisotropen Skelettierung von **TopoSkel** dargestellt. Ein Gewebevolument mit den Abmessungen von $60 \times 131 \times 432$ Voxeln und einer Voxelabmessung von $8.64 \mu\text{m} \times 3.96 \mu\text{m} \times 1.2 \mu\text{m}$ wurde zunächst isotrop skelettiert (a). Deutlich ist zu erkennen, dass das Skelett nicht glatt ist und sich darüber hinaus an den Kreuzungspunkten Fortsätze nach oben und unten befinden. Die von den Abmessungen der Voxel abhängige anisotrope Skelettierung (b) desselben Datensatzes liefert ein wesentlich glatteres Skelett ohne Fortsätze an den Kreuzungspunkten.

3.6.4. Resultate

In Abbildung 3.28 ist das Skelett des Endotheldatensatzes der Perfusionsserie 09 dargestellt.

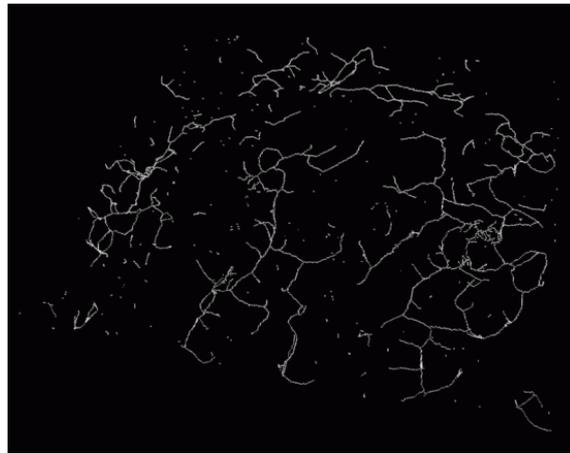


Abbildung 3.28.: Skelett des Endotheldatensatzes

3.7. Vektorisierung

Die Skelettierung liefert als Ergebnis wenige Objektvoxel, die das Skelett der Komponenten darstellen. Diese Komponenten sind mit den zusammenhängenden Strukturen der ursprünglichen Volumendatensätze identisch. Das Ziel der Vektorisierung besteht einerseits

darin, aus den Skelettvoxeln Linienzüge zu gewinnen und deren Länge zu berechnen, und andererseits aus der Erkennung von Linienkreuzungsvoxeln und deren Klassifizierung.

3.7.1. Algorithmus

Bei der Vektorisierung, also dem Zusammenfassen von einzelnen Voxeln zu Linienzügen, gilt es, nur die nötigsten Verbindungen zu schaffen.

Im eindimensionalen Fall ist die Lösung trivial - alle benachbarten Punkte können verbunden werden. Doch schon im Zweidimensionalen bereitet dieses Vorgehen Probleme. Hier kann man nicht zwischen allen benachbarten Pixeln eine Verbindung schaffen. Als Ergebnis entstünde anstatt einzelner Linienzüge vielmehr ein Netz aus einzelnen Liniensegmenten, wie in Abbildung 3.29 (b) dargestellt. Aus solchen Netzen lassen sich weder sinnvolle Längen gewinnen, noch können Kreuzungen richtig klassifiziert werden.

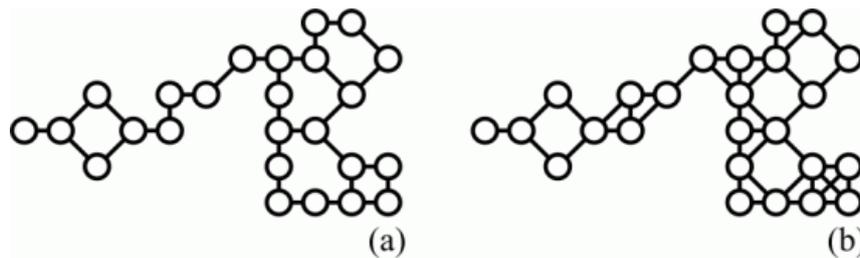


Abbildung 3.29.: Gute (a) und schlechte (b) Vektorisierung in 2D

Der von uns gewählte Lösungsweg liefert ein intuitives Ergebnis. Der Algorithmus teilt sich in mehrere Zwischenschritte, die im Folgenden näher erläutert sind:

Im ersten Schritt werden sämtliche isolierte Voxel, also Objektvoxel ohne benachbarte Objektvoxel, aus dem Datensatz extrahiert und für eine spätere Auswertung gezählt.

Danach werden einzelne Liniensegmente aus dem Datensatz gewonnen. Ein Liniensegment ist dabei eine Verbindung zwischen zwei benachbarten Voxeln. Allerdings ist hierbei darauf zu achten, dass keine unnötigen Segmente erzeugt werden. Um dies zu erreichen, werden zuerst Liniensegmente zwischen allen Voxeln erzeugt, die sich eine Fläche teilen. Ist dies geschehen, erfolgt die Erzeugung von Liniensegmenten zwischen Voxeln, welche eine Kante gemeinsam haben und nicht bereits im vorigen Schritt indirekt über ein Nachbarvoxel mit einem 2er Pfad verbunden worden sind. Zuletzt werden alle diejenigen Voxel

verbunden, die sich einen Eckpunkt teilen und noch nicht indirekt über ein Nachbarvoxel mit einem 2er Pfad Verbindung zueinander haben.

In Abbildung 3.30 sei ein Beispiel für den zweidimensionalen Fall aufgezeigt. Zunächst werden alle 4er Nachbarn verbunden (a) und danach alle 8er Nachbarn, welche nicht schon über einen 2er Pfad verbunden worden sind (b). Die gestrichelten Liniensegmente zwischen den Pixeln in (b) werden nicht erzeugt, da zwischen ihnen ein 2er Pfad über ein schon verbundenes Nachbarpixel besteht.

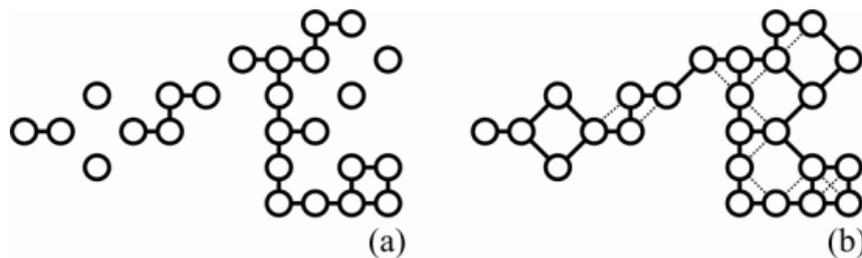


Abbildung 3.30.: Vektorisierung in 2D

Mit Hilfe der Liniensegmente ist es nun einfach, die einzelnen Voxel zu klassifizieren. Alle Voxel, von denen genau ein Liniensegment ausgeht, stellen Linienendvoxel dar. Als Ergebnis erhält man die Position und Anzahl dieser Linienendvoxel. Desweiteren sind alle Voxel, von denen mehr als zwei Liniensegmente ausgehen, Linienkreuzungsvoxel. Hier erhält man deren Anzahl und den Typ der Kreuzung. Der Typ eines Linienkreuzungsvoxels ist abhängig von der Anzahl der von ihm ausgehenden Liniensegmente. Alle anderen Voxel, von denen genau zwei Liniensegmente ausgehen, sind Teil einer Linie und bedürfen in diesem Schritt keiner weiteren Beachtung.

Ist die Klassifizierung der Skelettvoxel beendet, erfolgt die Erzeugung von Linienzügen. Als erstes werden alle Linienendvoxel abgearbeitet. Bei jedem von ihnen wird der Anfang eines Linienzuges angenommen und das zu ihm gehörende Liniensegment mit dem zweiten Liniensegment des benachbarten Linienvoxels verbunden. Der auf diese Weise entstandene Linienzug wird solange fortgesetzt und verlängert, bis das nächste betrachtete Voxel ein Linienendvoxel bzw. ein Linienkreuzungsvoxel ist. In diesem Fall endet der Linienzug an dieser Stelle.

Sind alle Linienendvoxel abgearbeitet, werden Linienzüge von den übrig gebliebenen Linienkreuzungsvoxeln aus gebildet und so lange verlängert, bis das nächste betrachtete Voxel wieder ein Linienkreuzungsvoxel ist. Der Linienzug endet an solch einer Stelle.

Nachdem alle Linienendvoxel und Linienkreuzungsvoxel betrachtet wurden, können sich

nur noch ringförmige, in sich geschlossene Strukturen, die aus Linienvoxeln bestehen, im Datensatz befinden. Sind also noch Linienvoxel im Datensatz vorhanden, werden solange Linienzüge von jeweils beliebig gewählten Linienvoxeln aus gebildet, bis alle Voxel abgearbeitet worden sind.

Parallel zur Erzeugung der Linienzüge kann deren Länge durch Addieren der Länge der einzelnen Liniensegmente berechnet werden. Die Länge der einzelnen Liniensegmente berechnet sich aus dem euklidischen Abstand der benachbarten Skelettvoxel. Um die Auflösung des Volumendatensatzes bei der Berechnung der Länge der Liniensegmente mit zu berücksichtigen, werden die drei Raumkoordinaten aller Skelettvoxel mit der Abmessung der Voxel in der jeweiligen Raumrichtung multipliziert.

3.7.2. Resultate

In Abbildung 3.31 ist die Oberfläche und das Skelett des Endotheldatensatzes der Perfusionsserie 09 dargestellt. Die Gesamtlänge des Skelettes aller Komponenten beträgt $13408.39 \mu\text{m}$. Insgesamt enthält es 753 Linienzüge, 633 Endpunkte und 290 Kreuzungspunkte. Die Kreuzungspunkte teilen sich auf in 287 3er Kreuzungen und 3 4er Kreuzungen.

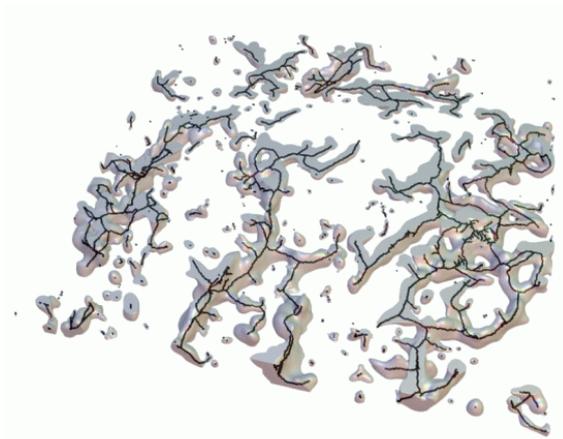


Abbildung 3.31.: Oberfläche und vektorisiertes Skelett des Endotheldatensatzes

3.8. Zusammenfassung der Bildverarbeitungskette

Die in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Glieder der Bildverarbeitungskette seien im Folgenden noch einmal zusammenfassend aufgezählt und in Abbildung 3.32 graphisch dargestellt.

- Im CLSM erzeugte Sätze optisch erfasster Schichtbilder: Endothelstrukturen und Muskelzellen
- Dekonvolution des Bildmaterials
- Zusammenführen der einzelnen Schichtbilder zu Volumendatensätzen
- Glättung und Ausheilung der Volumendaten mittels eines gekoppelten anisotropen nichtlinearen Reaktionsdiffusionssystems
- Berechnung des Bedeckungsgrades und Ermittlung des optimalen Schwellwertes
- Umwandlung des reellwertigen Endothel-datensatzes in einen Binärdatensatz mittels des optimalen Schwellwertes, alternativ mittels eines auf dem optimalen Schwellwert basierenden adaptiven Schwellwertes
- Berechnung der Kompaktheit
- Füllen von Hohlräumen
- anisotrope Skelettierung des Volumendatensatzes
- Vektorisierung des Skelettes und Gewinnung von Reifungsparametern des Skelettes

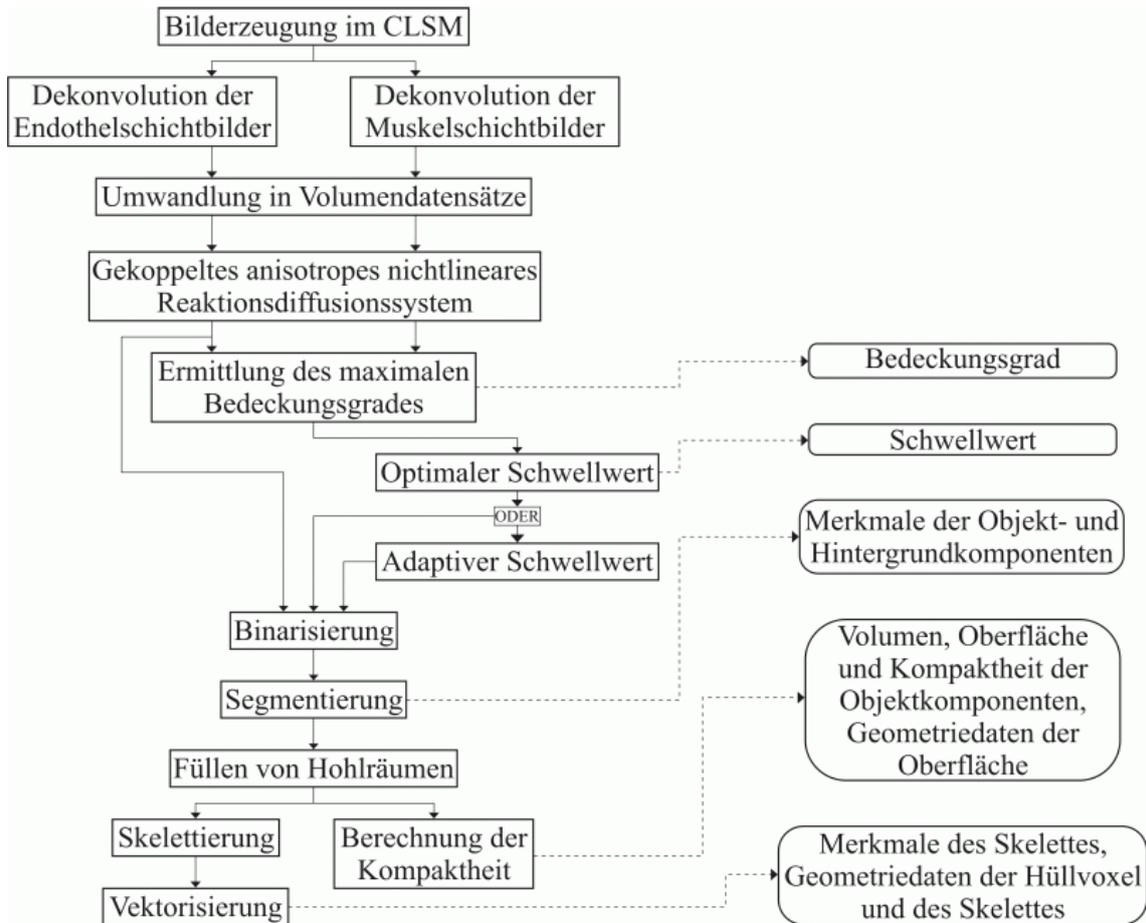


Abbildung 3.32.: Schema der Bildverarbeitungskette

Kapitel 4.

Visualisierung

Für den Menschen stellt die Visualisierung bestimmter Sachverhalte - in diesem Falle wissenschaftlicher Daten - einen zusätzlichen, seine Entscheidungen unterstützenden Faktor dar. Zwar ermöglichen die errechneten Reifungsparameter einen umfassenden quantitativen Überblick über den Inhalt der Volumendatensätze, ihre Visualisierung vermag jedoch die durch sie vermittelten Aussagen zu untermauern. Zum eigentlichen Ziel der vorliegenden Arbeit, der Extraktion von Reifungsparametern aus Volumendatensätzen, gesellt sich also auch der Wunsch nach einer sinnvollen Darstellung der in den Volumendatensätzen enthaltenen und aus ihnen erzeugten Strukturen.

Visualisierbare Daten entstehen im Verlauf der Bildverarbeitungskette praktisch nebenbei - sie sind lediglich Abfallprodukte bei der Berechnung einzelner Reifungsparameter. Die Kompaktheit der einzelnen Objektkomponenten des binären Endothel-datensatzes wird mittels des Marching Tetrahedron Algorithmus [GH 1994] berechnet. Dieser teilt, wie in Abschnitt 3.5.3. bereits beschrieben, den Volumendatensatz in einzelne Tetraeder auf. In jedem Tetraeder werden, falls Objektvoxel Eckpunkte des Tetraeders sind, die Schnittpunkte der Isofläche mit den Kanten des Tetraeders berechnet. Darauf aufbauend lassen sich das Volumen und die Oberfläche des betrachteten Teils einer Objektkomponente einzeln berechnen. Die Ermittlung der Schnittfläche aus den berechneten Schnittpunkten eines Tetraeders erzeugt also bereits die für eine Darstellung der Oberfläche eines Objektes notwendigen Dreiecke.

Weitere visualisierbare Daten produziert die Vektorisierung eines Skelettes. Gleich zu Beginn werden alle Oberflächenvoxel des binarisierten Datensatzes, die in ihrer 6er Nachbarschaft ein Hintergrundvoxel besitzen, markiert. Diese Hüllvoxel werden in Punkte umgewandelt und bieten eine alternative und übersichtliche Darstellung der Oberfläche von Objekten. Im skelettierten Datensatz werden alle benachbarten Skelettvoxel durch einzel-

ne Liniensegmente miteinander verbunden und diese einzelnen Segmente zu Linienzügen zusammengefasst. Weiterhin erfolgt die Zählung von Linienkreuzungsvoxeln bestimmter Typen und die Ermittlung isolierter Punkte im Raum. Die zuerst erzeugten einzelnen Liniensegmente, sowie alle ermittelten isolierten Punkte reichen bereits aus, um das Skelett eines Objektes graphisch darzustellen. Haben zwei oder mehrere aufeinanderfolgende Liniensegmente dieselbe Ausrichtung, ist es möglich, diese Liniensegmente zu einem einzigen Liniensegment zusammenzufassen. Dies spart unnötige Linien und resultiert in einer schnelleren Darstellung der Geometriedaten. Ein Beispiel für eine solche Zusammenfassung von Liniensegmenten ist in Abbildung 4.1 dargestellt. Bei gleichem Erscheinungsbild beinhaltet der Linienzug in (a) 24 Liniensegmente, der in (b) jedoch nur 14.

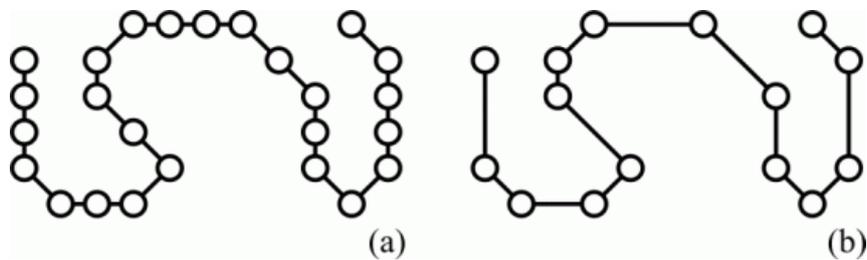


Abbildung 4.1.: Simplifizierung von Linienzügen

Die Visualisierung der Geometriedaten erfolgt mittels MathGL3d [Kus 2003], einem OpenGL-Viewer für Mathematica. Ein Screenshot des Programmes ist in Abbildung 4.2 zu sehen.

Kapitel 4. Visualisierung

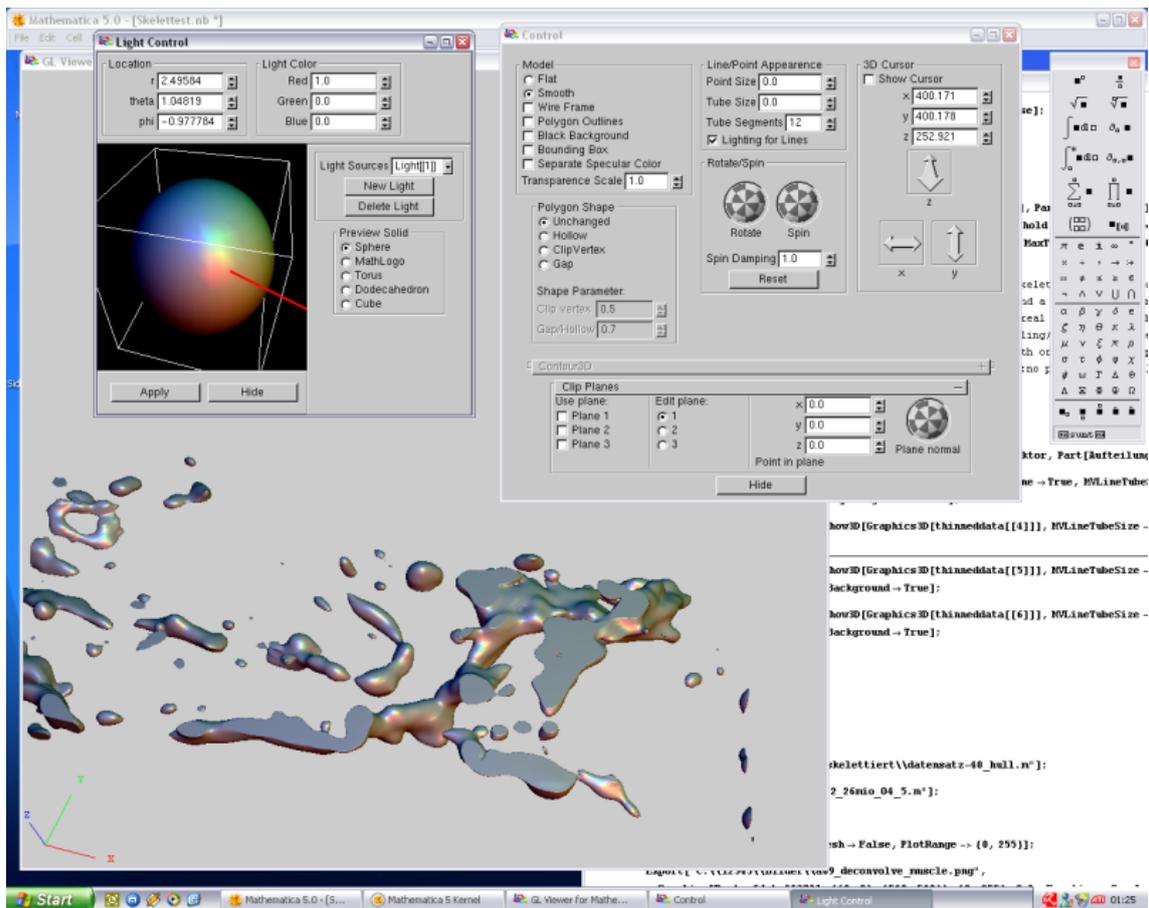


Abbildung 4.2.: Screenshot MathGL3d

Kapitel 5.

Bewertung der Reifungsparameter

Die aus den Volumendatensätzen extrahierten Werte der Reifungsparameter ermöglichen eine quantitative Bewertung der in ihnen enthaltenen Strukturen. Will man mehrere Gewebeprobe n bezüglich quantitativer Eigenschaften miteinander vergleichen, ist es notwendig, zu wissen, welche Ausprägungen der Reifungsparameter besser sind als andere. Dieses Kapitel dient der Zusammenfassung aller ermittelten Reifungsparameter sowie deren gewünschten Ausprägungen. Eine qualitative Bewertung eines Gewebevolument kann anhand der im Folgenden vorgeschlagenen Reifungsparameter stattfinden, ist jedoch nicht mehr Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

- Der Bedeckungsgrad spiegelt die Bedeckung der kapillaren Strukturen mit Muskelzellen wieder. Diese umschließen die Blutgefäße und stabilisieren sie dabei. Je größer der Bedeckungsgrad, desto unempfindlicher ist das Gefäßnetz gegenüber mechanischer Belastung. Die Kapillaren können nicht mehr so leicht zusammengedrückt werden - der Blutfluss wird dadurch nicht mehr behindert oder gar gestoppt.
- Das von Endothelzellen belegte Gewebevolumen gibt an, wieviel Prozent des Gesamtvolumens mit Endothelzellen ausgefüllt sind. Anhand dieses Wertes läßt sich überprüfen, inwiefern das betrachtete Gewebevolumen überhaupt versorgt werden kann und somit interessant für die weitere Auswertung ist. Aus einem sehr niedrigen prozentualen Anteil der Endothelzellen am Gesamtvolumen ließe sich so zum Beispiel schließen, dass sich die Ausbildung eines funktionsfähigen kapillaren Netzwerkes noch im Anfangsstadium befindet.
- Die Anzahl der Objektkomponenten entspricht der Anzahl nicht miteinander verbundener Blutgefäße. Im Idealfall gibt es nur eine Objektkomponente, die für die Durchblutung des Gewebes verantwortlich ist.

- Die Anzahl der Hintergrundkomponenten entspricht Volumenbereichen, die nicht von Endothelzellen belegt sind. Die größte verbundene Hintergrundkomponente ist mit dem zu versorgenden Gewebe, bzw. den zwischen diesem Gewebe und der Oberfläche der Kapillaren liegenden Muskelzellen, identisch. Alle anderen, kleineren Hintergrundkomponenten sind entweder von Endothelzellen umschlossene Volumen, die aus Gewebszellen bestehen, oder aber Hohlräume in den Kapillaren - innere Lumen, die von Blut durchströmt werden können.
- Die Anzahl der Voxel pro Komponente gibt die Größe derselben an. Zählt eine Objektkomponente wenige Voxel, handelt es sich entweder um ein kleines isoliert liegendes Gefäß oder aber einen Teil eines Blutgefäßes, das sich außerhalb des betrachteten Volumens fortsetzt. Eine große Objektkomponente entspricht einem großen Blutgefäß - je größer, desto größer ist dessen Beitrag zur Versorgung des Gewebes. Allerdings sollte es nicht das gesamte Gewebenvolumen ausfüllen, da sonst kaum mehr Platz für Gewebszellen bleibt, die es zu versorgen gilt.
- Einen wesentlich besseren Anhaltspunkt für die Größe einer Komponente liefert jedoch ihr Volumen. Dieses wird im Rahmen der Rekonstruktion der tatsächlichen Oberfläche berechnet und bietet ein genaueres Ergebnis als die Anzahl der Voxel.
- Die Kompaktheit einer Komponente besteht im Verhältnis ihres Volumens zu ihrer Oberfläche. Nur solche Zellen, die sich in der Nähe (bis ca. 100 μm) der Oberfläche eines Blutgefäßes befinden, werden ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Je kompakter, d.h. je kugelförmiger eine Komponente ist, desto weniger Zellen befinden sich an bzw. in der Nähe ihrer Oberfläche und können von ihr versorgt werden, isolierte kapillare Strukturen liefern gar keinen Beitrag zur Durchblutung. Je unkompakter, also im Gewebe verteilter, eine Komponente ist, desto mehr Gewebszellen können von ihr versorgt werden.
- Die Anzahl der Endpunkte gibt ebenfalls Aufschluss über die versorgende Funktion eines Blutgefäßsystems. Ein Endpunkt bedeutet eine Sackgasse - er ist das Ende eines Blutgefäßes. Eine Durchblutung ist nicht möglich, da kein zirkulationsermöglichender Abfluss existiert. Je niedriger die Anzahl der Endpunkte, desto besser die Durchblutung des Gewebes.
- Die Anzahl der Linienzüge einer Komponente bietet einen Überblick über den Grad ihrer Verästelung. Je mehr Verästelungen eine Komponente aufweist, desto verzweigter ist sie. Die Anzahl der Linienzüge hängt direkt mit der Anzahl der Kreuzungen zusammen.

- Die Anzahl der Kreuzungen einer Komponente sagt etwas über deren Vernetzungsgrad aus. Besitzt eine Komponente gar keine Kreuzungen, so handelt es sich um ein Gefäß ohne Verzweigungen. Je höher die Anzahl von Kreuzungen, desto verzweigter ist eine kapillare Struktur. Die Bildung verzweigter Blutgefäße verbessert die Versorgung der Gewebszellen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Das Gewebe wird von Blutgefäßen besser durchdrungen.
- Die Art der Kreuzungen sagt ebenfalls etwas über den Vernetzungsgrad der Kapillaren aus. Je mehr Blutgefäße sich an einer Kreuzung treffen, desto verzweigter stellt sich das Gewebe dar. Treten in einem Gefäßnetz bestimmte Kreuzungstypen in regelmäßigen Abständen auf, ermöglicht dies eine weiterführende fraktale Analyse.
- Die Gesamtlänge einer Komponente, also die einer kapillaren Struktur, sollte möglichst groß sein. Hat die Länge einer Komponente einen niedrigen Wert, so liegt diese entweder von anderen Kapillaren isoliert im Volumen und entspricht einer Insel aus Endothelzellen inmitten von Fettgewebszellen oder gehört zu einer Komponente, die sich außerhalb des betrachteten Gewebevolument fortsetzt.
- Die Gesamtgefäßlänge der Kapillaren in einem Volumen ist ein Indikator für die Güte einer Gewebeprobe. Wünschenswert sind Kapillaren, die nicht isolierte Strukturen, sondern ein einziges verbundenes Gefäßnetz mit möglichst großer Gesamtlänge bilden. Je größer die Gesamtlänge, desto mehr Gefäße befinden sich im Gewebe und versorgen die Gewebszellen mit Sauerstoff und Nährstoffen - sie gibt somit Aufschluss über die Gesamtversorgung eines Gewebevolument.

Wünschenswert ist also ein kapillares Netzwerk, welches einen hohen Bedeckungsgrad aufweist, aus einer großen, möglichst unkompakten Komponente besteht, wenige Endpunkte aber viele Kreuzungen besitzt und eine hohe Gesamtlänge hat.

Kapitel 6.

Ergebnisse

In diesem Kapitel sind die Ergebnisse der Analysen aller untersuchten Bildserien vorgestellt. Es wurden sowohl aktuelle, als zusätzlich auch ältere Bildserien ausgewertet. Bei letzteren geschah die Auswertung im Hinblick auf einen Vergleich zwischen automatischer und interaktiver Messmethode, welche den bisherigen Goldstandard bei der Ermittlung der Länge eines Gefäßnetzwerkes repräsentiert. Anhand dieses Vergleiches soll verdeutlicht werden, inwiefern die Ergebnisse von automatischer und interaktiver Messmethode korrelieren.

6.1. Auswertung der aktuellen Bildserien

Insgesamt wurden 22 Bildserien unter Verwendung der in dieser Arbeit vorgestellten Bildverarbeitungskette analysiert. Die aus ihnen extrahierten Reifungsparameter sind in den Tabellen 6.1 und 6.2 aufgelistet.

Bildserie	θ	BG	OK	HK	A_{ges} in μm^2	V_{ges} in μm^3	ϕ gC	EV
Anfang01	4.5	26.43%	138	2	813229.48	4742758.99	0.0740	12.07%
Anfang02	4.5	58.74%	33	1	315928.66	1712810.28	0.0353	4.36%
Anfang03	4.5	53.04%	63	1	238411.63	1307787.60	0.1368	3.33%
Anfang05	4.5	25.38%	307	1	1362251.58	7050713.37	0.0536	17.94%
Anfang06	13.5	26.82%	111	1	923785.45	5254120.43	0.0364	13.37%
Kontroll01	4.5	13.42%	222	2	708446.10	3679716.54	0.1471	9.36%
Kontroll02	4.5	3.53%	204	1	773336.78	4219432.20	0.0979	10.74%
Kontroll03	1.1	17.89%	366	8	1033481.88	5786538.79	0.0452	14.72%
Kontroll04	3.7	16.56%	185	1	909314.81	5428483.71	0.0360	13.81%
Kontroll05	2.1	3.97%	365	2	1268602.53	7214195.79	0.0282	18.36%
Kontroll06	4.5	10.04%	302	1	1084340.59	6609678.18	0.0718	16.82%
Perfusion01	4.7	7.53%	118	3	1172895.57	7966085.10	0.0252	20.27%
Perfusion02	0.8	42.39%	491	7	1167510.02	5792486.81	0.0318	14.74%
Perfusion03	0.6	72.64%	269	1	668636.76	3850861.04	0.0276	9.80%
Perfusion04	0.1	78.76%	719	8	1463060.75	8264733.79	0.0226	21.03%
Perfusion05	1.0	53.04%	273	55	918558.37	5298849.94	0.0322	13.48%
Perfusion06	4.5	21.60%	431	3	839590.24	4777258.80	0.0680	12.16%
Perfusion07	4.1	30.52%	181	2	601083.08	3700947.80	0.0608	9.42%
Perfusion08	2.2	48.74%	264	1	654330.31	3787158.37	0.0845	9.64%
Perfusion09	3.1	47.63%	227	2	878566.64	4959003.15	0.0615	12.62%
Perfusion10	3.0	45.40%	229	1	703249.01	4092976.08	0.0842	10.42%
Perfusion11	5.0	35.25%	239	1	975415.10	5438165.28	0.1238	13.84%
Mittelwert	3.68	33.61%	260.77	4.77	885182.97	5042489.18	0.0629	12.83%
Std.abw.	2.71	21.68%	152.17	11.44	304836.12	1760700.91	0.0369	4.48%

Tabelle 6.1.: Reifungsparameter aller Bildserien I

θ bezeichnet hierbei den optimalen Schwellwert, BG den maximalen Bedeckungsgrad, OK die Anzahl der Objektkomponenten, HK die Anzahl der Hintergrundkomponenten vor dem Füllen der Hohlräume mit Objektvoxeln, A_{ges} die Gesamtoberfläche aller Objektkomponenten eines Datensatzes, V_{ges} das Gesamtvolumen aller Objektkomponenten

eines Datensatzes, \varnothing gC die durchschnittliche gewichtete Kompaktheit aller Objektkomponenten eines Datensatzes, EV das von Endothelzellen, also Objektkomponenten, belegte Volumen in einem Datensatz und L_{ges} die Gesamtlänge des Skelettes eines Datensatzes. Das reale Gewebevolumen betrug bei allen Datensätzen $0.03929794413 \text{ mm}^3$. Bei den Bildserien Anfang 01-05 und Kontroll 01-02 war die Ermittlung des maximalen Bedeckungsgrades nicht möglich, da dessen Werte mit zunehmendem Schwellwert stetig sanken. In solchen Fällen wurde $\theta=4.5$ gesetzt. Die Verwendung dieses Schwellwertes lieferte Binärdatensätze, welche sich für die weitere Verarbeitung eigneten. Als Bedeckungsgrad wurde der jeweils zu $\theta=4.5$ gehörende Bedeckungsgrad des entsprechenden Datensatzes angegeben. Bei allen anderen Bildserien war die Ermittlung des maximalen Bedeckungsgrades möglich. Der Bedeckungsgrad variierte zwischen 3.53% (Kontroll 02) und 78.76% (Perfusion 04). Im Mittel lag er bei 33.61% mit einer Standardabweichung von 21.68%. Die Schwellwerte lagen zwischen 0.1 (Perfusion 04) und 13.5 (Anfang 06). Der Mittelwert lag hier bei 3.68 und die Standardabweichung betrug 2.71.

Die Anzahl der Objektkomponenten reichte von 33 (Anfang 02) bis 719 (Perfusion 04), durchschnittlich lagen 260.77 Objektkomponenten mit einer Standardabweichung von 152.17 in einem Datensatz. Die meisten Objektkomponenten hatten jedoch nur ein geringes Volumen und lagen isoliert im Volumen. In der Hälfte aller Datensätze existierte vor dem Füllen der Hohlräume mit Objektvoxeln nur eine große zusammenhängende Hintergrundkomponente, welche mit dem umliegenden Gewebe identisch war. Somit gab es in diesen Datensätzen keinen Hinweis auf innere Lumen innerhalb der endothelen Strukturen. Perfusion 05 hingegen besaß 55 Hintergrundkomponenten, im Durchschnitt enthielt jeder Datensatz 4.77 von ihnen. Die Standardabweichung betrug hierbei 11.44.

Die Endothelstrukturen von Anfang 03 besaßen mit $238411.63 \mu\text{m}^2$ die kleinste Gesamtoberfläche und mit $1307787.6 \mu\text{m}^3$ das kleinste Gesamtvolumen. Perfusion 04 enthielt die Endothelstrukturen mit der größten Gesamtoberfläche in Höhe von $1463060.75 \mu\text{m}^2$ und dem größten Gesamtvolumen, welches $8264733.79 \mu\text{m}^3$ betrug. Im Mittel lagen Gesamtoberfläche und Gesamtvolumen bei $885182.97 \mu\text{m}^2$ bzw. $5042489.18 \mu\text{m}^3$. Die entsprechenden Standardabweichungen betrugen $304836.12 \mu\text{m}^2$ und $1760700.91 \mu\text{m}^3$.

Die durchschnittliche gewichtete Kompaktheit war bei Perfusion 04 mit 0.0226 am kleinsten und bei Kontroll 01 mit 0.1471 am größten. Diese gewichteten Werte gingen aus der Kompaktheit aller Objektkomponenten hervor. Im Mittel lag sie bei 0.0629 mit einer Standardabweichung von 0.0369. Interessanter für die Auswertung ist jedoch die Kompaktheit der einzelnen Objektkomponenten eines Datensatzes. Das von Endothelzellen belegte Volumen schwankte zwischen 3.33% bei Anfang 03 und 21.03% bei Perfusion 04. Der Mittelwert betrug 12.83% und die Standardabweichung 4.48%.

Kapitel 6. Ergebnisse

Bildserie	Linienzüge	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er	5er	L_{ges} in μm
Anfang01	523	408	211	206	5	0	12031.87
Anfang02	342	199	161	159	2	0	5879.90
Anfang03	151	160	47	46	1	0	3131.07
Anfang05	1346	973	568	555	13	0	24010.18
Anfang06	1137	625	546	535	11	0	17923.26
Kontroll01	463	518	136	136	0	0	9398.52
Kontroll02	535	528	179	174	5	0	10461.71
Kontroll03	1180	956	460	444	16	0	16348.22
Kontroll04	898	599	395	387	8	0	16027.37
Kontroll05	1368	995	575	563	12	0	22635.53
Kontroll06	936	815	350	345	5	0	15832.03
Perfusion01	1313	669	644	619	25	0	22186.83
Perfusion02	1618	1319	673	657	16	0	23825.48
Perfusion03	822	698	311	305	5	1	11106.88
Perfusion04	2088	1794	784	758	26	0	26168.15
Perfusion05	1582	636	785	698	75	12	17591.19
Perfusion06	1141	1070	397	383	13	1	15108.09
Perfusion07	728	562	294	285	8	1	10553.82
Perfusion08	631	643	206	205	1	0	9629.43
Perfusion09	753	633	290	287	3	0	13408.39
Perfusion10	665	620	235	232	3	0	9974.85
Perfusion11	697	649	246	239	7	0	12148.78
Mittelwert	950.77	730.41	386.04	373.54	11.82	0.68	14790.07
Std.abw.	472.2	357.51	214.65	202.22	15.84	2.55	6157.19

Tabelle 6.2.: Reifungsparameter aller Bildserien II

Die Anzahl der Linienzüge im Skelett schwankte zwischen 151 (Anfang 03) und 2088 (Perfusion 04), das Skelett eines jeden Datensatzes enthielt durchschnittlich 950.77 Linienzüge bei einer Standardabweichung von 472.2. Anfang 03 besaß mit 160 die wenigsten und Perfusion 04 mit 1794 die meisten Endpunkte im Skelett. Im Mittel betrug die Anzahl der Endpunkte eines Skelettes 730.41 und die Standardabweichung 357.51.

Die Anzahl der Kreuzungen in einem Skelett lag zwischen 47 (davon 46 3er und eine 4er) bei Anfang 03 und 785 (davon 698 3er, 75 4er und 12 5er) bei Perfusion 05. Durchschnittlich traten in den Skeletten der Datensätze 386.04 Kreuzungen (davon 373.54 3er, 11.82 4er und 0.68 5er) auf. Die Standardabweichung betrug insgesamt 214.65, bei den

3er Kreuzungen 202.22, den 4er Kreuzungen 15.84 und bei den 5er Kreuzungen 2.55. Anfang 03 besaß mit $3131.07 \mu\text{m}$ die kleinste Gesamtlänge des Skelettes, Perfusion 04 mit $26168.15 \mu\text{m}$ die größte. Die durchschnittliche Gesamtlänge der Skelette betrug $14790.07 \mu\text{m}$ und die Standardabweichung lag bei 6157.19.

Eine detaillierte Auswertung aller Bildserien befindet sich, zusammen mit den wichtigsten Abbildungen zum optischen Vergleich, in Anhang B dieser Arbeit. Die Ergebnisdateien mit allen aus den Bildserien extrahierten Werten befinden sich auf dem dieser Arbeit beiliegenden Datenträger.

Alle aus den Datensätzen extrahierten Reifungsparameter hängen direkt von der Lokalisation des betrachteten Bereiches im Probenquerschnitt und den angewandten Wachstumsparametern ab. Sowohl die Lage der untersuchten Gewebevolumen als auch die Werte der in der Wachstumsphase vorherrschenden Parameter waren nicht bekannt.

Nachdem alle Reifungsparameter aus den Datensätzen extrahiert worden sind, die quantitative Auswertung also abgeschlossen ist, kann eine qualitative Auswertung der Gewebevolumen stattfinden.

6.1.1. Vergleich Anfangs-, Kontroll- und Perfusionsgruppe

Zusätzlich zur Auswertung aller untersuchter Bildserien wurden die Ergebnisse der einzelnen Gruppen untereinander verglichen. Im Verlauf der Wachstumsphase, vom Anfertigen der Gewebssäquivalente über die Entnahme von Gewebeproben der Anfangsgruppe bis hin zur Entnahme von Gewebeproben der Kontroll- und Perfusionsgruppe, blieben die Werte der Wachstumsparameter annähernd konstant. Lediglich die Umstände des Gewebewachstums bei Kontroll- (ungerichtete Dynamik) und Perfusionsgruppe (gerichtete Dynamik) waren unterschiedlich. In Tabelle 6.3 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aller ermittelten Reifungsparameter für jede der drei Gruppen aufgeführt.

Ein tiefgreifender Vergleich der Wachstumsmethoden war an dieser Stelle jedoch nicht möglich, da zum einen bei den Bildserien 01-05 der Anfangsgruppe und den Bildserien 01-02 der Kontrollgruppe der maximale Bedeckungsgrad nicht zu ermitteln war, und andererseits ein Stichprobenumfang von 5 Bildserien der Anfangsgruppe, 6 Bildserien der Kontrollgruppe und 11 Bildserien der Perfusionsgruppe zu gering ist. Dennoch sind im derzeitigen Stadium der Forschungen zum Gewebewachstum bereits Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar.

Bei der Anfangsgruppe betrug der mittlere Bedeckungsgrad 38.08%. Die mittleren Bede-

ckungsgrade von Kontroll- und Perfusionsgruppe betragen 10.9% bzw. 43.95% (Abbildung 6.1 (a)).

	Anfangsgruppe	Kontrollgruppe	Perfusionsgruppe
θ	6.3 (4.02)	3.4 (1.46)	2.65 (1.81)
BG	38.08% (16.39%)	10.9% (6.17%)	43.95% (20.59%)
OK	130.4 (106.83)	274 (81.31)	312.82 (170.81)
HK	1.2 (0.45)	2.5 (2.74)	7.64 (15.89)
A_{ges} in μm^2	730721.36 (462961.55)	962920.45 (208199.92)	912990.53 (267076.79)
V_{ges} in μm^3	4013638.13 (2444876.04)	5489674.2 (1357182.23)	5266229.65 (1579203.95)
\emptyset gC	0.07 (0.07)	0.07 (0.05)	0.06 (0.03)
EV	10.21% (6.22%)	13.97% (3.45%)	13.4% (4.02%)
Linienzüge	699.8 (517)	896.67 (352.95)	1094.36 (493.07)
Endpunkte	473 (335.55)	735.17 (215.07)	844.82 (390.77)
Kreuzungen	306.6 (236.31)	349.17 (167.2)	442.27 (230.2)
3er	300.2 (231.02)	341.5 (162.44)	424.36 (212.59)
4er	6.4 (5.37)	7.67 (5.68)	16.54 (21.21)
5er	0 (0)	0 (0)	1.36 (3.56)
L_{ges} in μm	12595.26 (8568.44)	15117.23 (4769.84)	15609.26 (5971.54)

Tabelle 6.3.: Vergleich der drei Wachstumsgruppen: Mittelwerte und Standardabweichungen (in Klammern) der Reifungsparameter

Die gerichtete Dynamik innerhalb der Perfusionskammer scheint, im Gegensatz zur ungegerichteten Dynamik innerhalb des Rotationskulturcontainers, die Bedeckung der endothelen Strukturen mit Muskelzellen zu fördern und somit zur Stabilisierung der Kapillaren beizutragen.

Die mittlere Anzahl der Objektkomponenten betrug bei der Anfangsgruppe 130.4, bei der Kontrollgruppe 274 und bei der Perfusionsgruppe 312.82 (Abbildung 6.1 (b)). Die Anfangsgruppe enthielt durchschnittlich 1.2 Hintergrundkomponenten, Kontroll- und Perfusionsgruppe enthielten im Durchschnitt 2.5 bzw. 7.64 Hintergrundkomponenten (Abbildung 6.1 (c)). Die Perfusionsgruppe enthält zwar mehr Objektkomponenten, jedoch auch mehr Hintergrundkomponenten. Dies läßt auf die Ausbildung von Hohlräumen innerhalb der endothelen Strukturen schließen. Aus solchen Hohlräumen können sich wiederum innere Lumen entwickeln.

Die mittlere Gesamtoberfläche der Anfangsgruppe beträgt $730721.36 \mu\text{m}^2$, ihr mittleres Gesamtvolumen $4013638.13 \mu\text{m}^3$. Die mittlere Gesamtoberfläche der Kontroll- und Perfusionsgruppe beträgt $962920.45 \mu\text{m}^2$ bzw. $912990.53 \mu\text{m}^2$, ihr mittleres Gesamt-

volumen liegt bei $5489674.2 \mu\text{m}^3$ bzw. $5266229.65 \mu\text{m}^3$ (Abbildung 6.1 (d) bzw. (e)). Die Werte der Gesamtoberfläche und des Gesamtvolumens der Perfusionsgruppe liegen ein wenig unter den Werten der Kontrollgruppe. Ebenso verhält es sich mit der durchschnittlichen gewichteten Kompaktheit ϕ gC und dem Verhältnis von mit Endothelzellen belegtem Volumen zum Gesamtvolumen EV.

Die durchschnittliche Anzahl der Linienzüge im erzeugten Skelett beträgt bei der Anfangsgruppe 699.8, bei der Kontrollgruppe 896.67 und bei der Perfusionsgruppe 1094.36 (Abbildung 6.1 (f)). Die mittlere Anzahl der Endpunkte im erzeugten Skelett beträgt bei der Anfangsgruppe 473, bei der Kontrollgruppe 735.17 und bei der Perfusionsgruppe 844.82 (Abbildung 6.1 (g)). Im Mittel enthält ein Skelett der Anfangsgruppe 306.6 Kreuzungen, eines der Kontrollgruppe 349.17 Kreuzungen und eines der Perfusionsgruppe 442.27 Kreuzungen (Abbildung 6.1 (h)). An den Datensätzen der drei Gruppen kann man im Hinblick auf den Vernetzungsgrad gut erkennen, wie die Anzahl der Linienzüge, die Anzahl der Endpunkte und die Anzahl der Kreuzungen eines Skelettes zusammenhängen. Die mittlere Gesamtlänge eines Skelettes der Anfangsgruppe liegt bei $12595.26 \mu\text{m}$. Bei der Kontrollgruppe beträgt sie $15117.23 \mu\text{m}$ und bei der Perfusionsgruppe $15609.26 \mu\text{m}$ (Abbildung 6.1 (i)).

Insgesamt zeigt sich, dass die gerichtete Dynamik innerhalb der Perfusionskammer einen scheinbar positiven Einfluß auf die Ausbildung endotheler Strukturen ausübt. Genauere Angaben können jedoch erst nach der Analyse weiterer Datensätze gemacht werden, da der Stichprobenumfang zur Zeit noch zu gering ist.

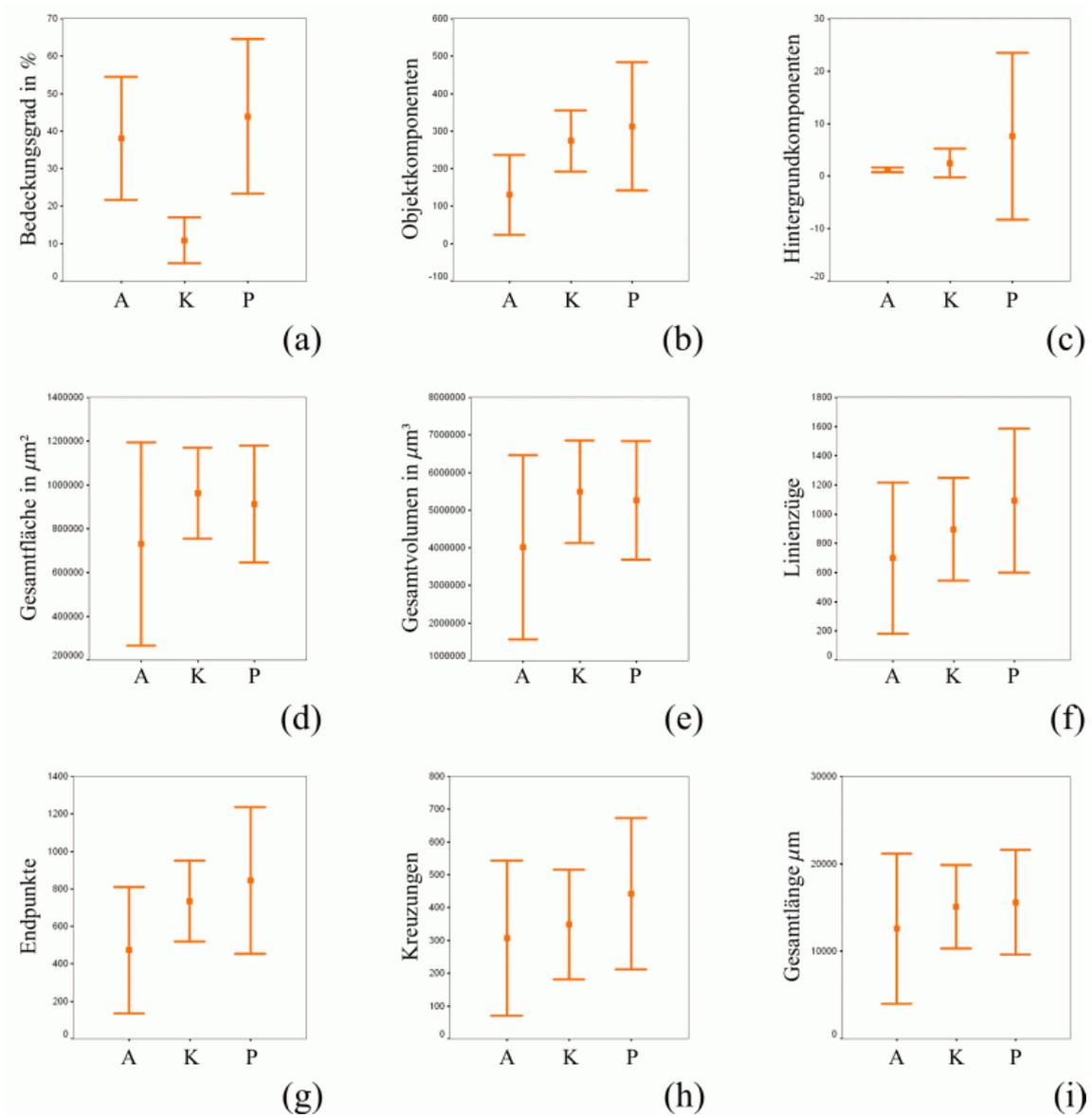


Abbildung 6.1.: Fehlerbalken (Mittelwerte \pm Standardabweichung) der Reifungsparameter von Anfangs- (A), Kontroll- (K) und Perfusionsgruppe (P)

6.2. Vergleich zur interaktiven Ausmessung

Erste Untersuchungen zur Ausbildung kapillarer Netzwerke in Endothelzellen enthaltenden Gewebevolumen wurden bereits im Jahre 1998 durchgeführt. Die Gerüstsubstanz dieser frühen Gewebsäquivalente bestand, im Gegensatz zu den heute dafür genutzten Kollagenröhrchen, aus so genannten Microcarriers - kleinen Dextrankügelchen. Besiedelt wurde die Gerüstsubstanz nur mit Endothelzellen. Nach einer Wachstumsphase erfolgte die Probenentnahme und daran anschließend die Färbung mit endothelzellspezifischen, fluoreszierenden Markern. Als Fluoreszenzfarbstoff fand hierbei größtenteils UEA-I-Lektin und in geringerem Maße auch CD31 Verwendung. Nach der Färbung wurden aus den Gewebeproben mittels eines CLSM optisch erfasste Schichtbilder erzeugt. Diese Schichtbilder haben eine Auflösung von 512×512 Pixel und jedes Pixel entspricht einer Fläche von $1.56 \mu\text{m} \times 1.56 \mu\text{m}$ (ca. $2.43 \mu\text{m}^2$). Der Abstand der optischen Schnittebenen im Gewebe liegt bei $2.31 \mu\text{m}$. Die Ausmessung kapillarer Strukturen in den einzelnen Schichtbildern eines Datensatzes, also die Bestimmung der Gefäßlänge, erfolgte interaktiv. In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der interaktiven Messmethode mit denen der automatischen Ausmessung verglichen.

Bei der interaktiven Messung fährt man mit dem Mauszeiger den Verlauf kapillarer Strukturen ab. Die zurückgelegte Wegstrecke des Mauszeigers entspricht, nach Umrechnung abhängig von der Pixelgröße, der Länge des betrachteten Gefäßes im aktuellen Schichtbild. Die Länge einer zusammenhängenden kapillaren Struktur setzt sich aus ihren Teillängen in den einzelnen Schichtbildern zusammen. Eine interaktive Messung der Kapillarlänge kann innerhalb eines Schichtbildes relativ genau erfolgen. Der räumliche Verlauf kapillarer Strukturen durch die Schichtbilder hindurch, also in die Tiefe des Volumens, ist jedoch nicht so einfach nachvollziehbar, da dem Messenden infolge der alleinigen Betrachtung von Schichtbildern eine dreidimensionale Ansicht des Datensatzes und somit eine zusätzliche Entscheidungsfindung verwehrt bleibt. Die Genauigkeit der interaktiven Längenmessung ist infolge dessen von der Ausrichtung der Endothelstrukturen abhängig. Auch deren Form übt einen Einfluss auf das Messergebnis aus. So können dicke, parallel zur optischen Schnittebene verlaufende Strukturen eventuell in mehreren Schichten markiert und gemessen werden. Aufgrund unterschiedlicher Bedingungen bei der Bilderzeugung aus den Gewebeproben können die Intensitätswerte gleichartiger kapillarer Strukturen in den Schichtbildern unterschiedlich ausgeprägt sein. Die durch die Subjektivität des interaktiv Messenden beeinflusste Entscheidung über den Verlauf der gedachten Mittelachse in den Kapillaren kann von solchen unterschiedlichen Intensitätswerten abhängig sein.

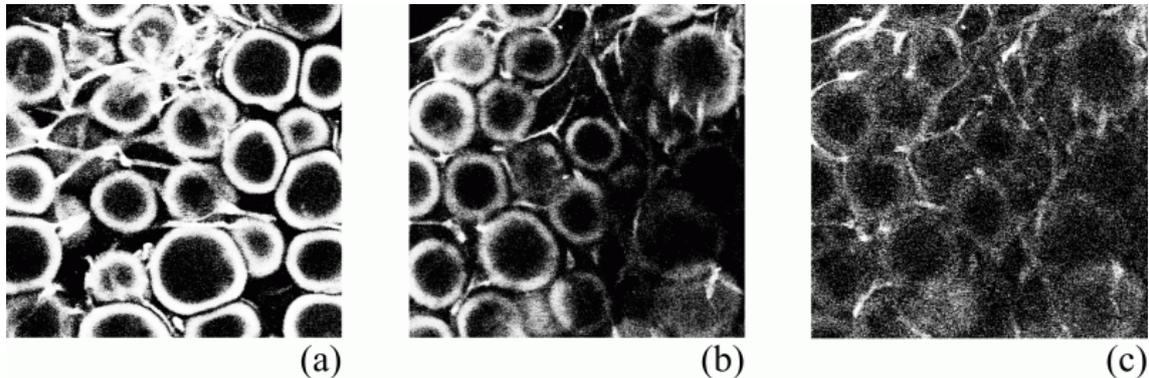


Abbildung 6.2.: Ausgangsqualität des Bildmaterials: ringförmige Strukturen (a), ungleichmäßige Ausleuchtung (b) und Rauschen (c)

Die automatische Ausmessung eines aus den einzelnen Schichtbildern erzeugten Volumendatensatzes mittels Skelettierung und anschließender Vektorisierung des entstandenen Skelettes ist frei von subjektiven Entscheidungen bezüglich der Lage des Skelettes im Inneren endotheler Strukturen. Die Skelettierung erfolgt anisotrop und berücksichtigt so die Abmessungen der Voxel ($1.56 \mu\text{m} \times 1.56 \mu\text{m} \times 2.31 \mu\text{m}$) - die Ausrichtung der Kapillaren im Volumen ist nicht länger von Bedeutung. Desweiteren ist die automatische Berechnung der Kapillarlängen im Gegensatz zur interaktiven Messmethode in vergleichsweise sehr kurzer Zeit durchführbar.

Bevor jedoch die eigentliche Skelettierung der Volumendatensätze durchgeführt werden konnte, mussten die ihnen zugrunde liegenden Schichtbilder in brauchbares Bildmaterial umgewandelt werden. Die teilweise sehr schlechte Qualität der Schichtbilder (Abbildung 6.2) hatte im wesentlichen drei Ursachen. Das größte Problem stellten die in den Schichtbildern enthaltenen ringförmigen Strukturen dar. Diese Ringstrukturen waren das Resultat einer übermäßigen Konzentration von Endothelzellmarkern auf der Oberfläche der Microcarrier und traten in den Schichtbildern aller Datensätze verschieden stark auf. Sie waren aufgrund ihrer unterschiedlichen Ausprägung bezüglich Größe, Form und Intensität nicht so einfach aus den Schichtbildern zu entfernen und erschwerten somit die automatische Identifikation und Längenmessung relevanter kapillarer Strukturen. Desweiteren wurden die im Volumen enthaltenen endothelen Strukturen häufig von diesen Ringstrukturen überlagert. Sie zu entfernen war der wichtigste Schritt innerhalb der Vorverarbeitung des Bildmaterials. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Bildqualität bestand in der regional unterschiedlich starken Diffusion der Fluoreszenzfarbstoffe in die Gewe-

beproben hinein. Da sich die Farbstoffe nicht gleichmäßig im Volumen verteilen und somit in ihrer Eigenschaft als endothelzellspezifische Marker nicht in allen Regionen des Volumens gleichermaßen wirksam werden konnten, erschienen die im CLSM optisch erfassten Schichtbilder ungleichmäßig ausgeleuchtet. Schwankungen der Intensitätswerte gleichartiger kapillarer Strukturen waren die Folge. Schließlich war auch noch das Rauschen, wie bereits im Kapitel zur Bilderzeugung näher erläutert, in den Schichtbildern als Einflussfaktor von Bedeutung.

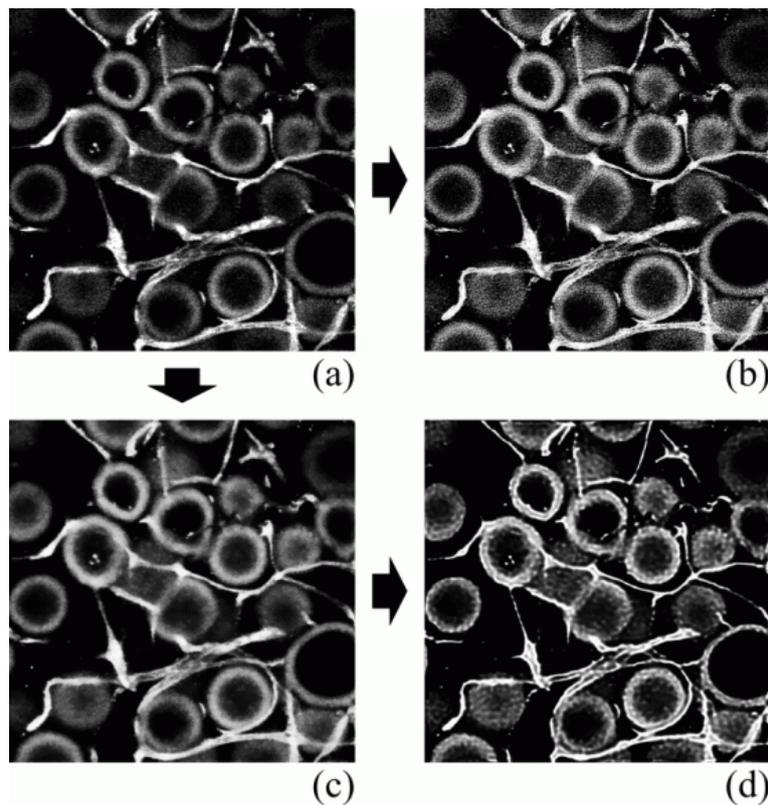


Abbildung 6.3.: Schichtbild (a), ohne TV-Filterung entfaltetes Bild (b), TV-gefiltertes Schichtbild (c) und mit TV-Filterung entfaltetes Bild (d)

Die Vorverarbeitung des Bildmaterials begann, noch vor der Dekonvolution [Ric 1972]/ [Luc 1974], mit einer TV-Filterung (Total Variation Filterung) [BCMW 1997]. Dies war notwendig, da die optisch erfassten Schichtbilder von sehr schlechter Qualität waren. Insbesondere die Schichtbilder, welche unter Verwendung von CD31 als Endothelzellmar-

ker erzeugt worden sind, enthielten sehr starkes Rauschen. Dieses Rauschen wirkt sich erheblich auf die Konvergenz der Dekonvolution und somit auf die Qualität der entfalten Bilder aus. Nachdem die TV-Filterung erfolgte, wurden diese Bilder entfaltet (Abbildung 6.3).

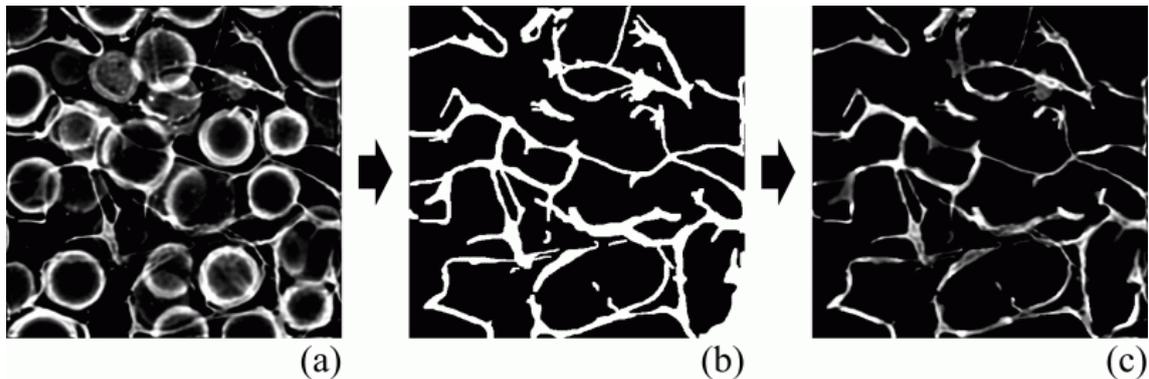


Abbildung 6.4.: Maximumprojektion (a), Maske (b) und maskierte Maximumprojektion (c) des Datensatzes go0906uea1

Danach erfolgte die Erzeugung der Maximumprojektion aller Schichtbilder eines Datensatzes. Sie lieferte einen Überblick über die Gesamtinformation des Datensatzes bezüglich der Lage, der in ihm enthaltenen Endothel- und Ringstrukturen. Die einfachste Variante, alle Ringstrukturen und das Hintergrundrauschen aus der Maximumprojektion zu entfernen, bestand im manuellen Ausmaskieren aller Bildregionen, die nicht mit Endothelzellen belegt waren (Abbildung 6.4). Alternativ ist auch das Ausmaskieren aller Endothelstrukturen und anschließend das Invertieren dieser Maske möglich.

Nachdem alle unerwünschten Strukturen ausmaskiert worden sind, konnte die entstandene Maske auf alle Schichtbilder eines Datensatzes angewandt werden und es entstand ein Datensatz, in welchem nur noch Kapillaren vorkamen. Nach dieser Prozedur lagen die Schichtbilder als bereinigte Grauwertbilder vor und konnten in Volumendatensätze umgewandelt werden. Eine Glättung derselben bildete den Abschluss der Vorverarbeitung. Daran anschließend erfolgte die Skelettierung der Volumendatensätze und die Vektorisierung des entstandenen Skelettes (Abbildung 6.5). Letztere lieferte das Ergebnis der automatischen Längenausmessung im Volumendatensatz enthaltener kapillarer Strukturen.

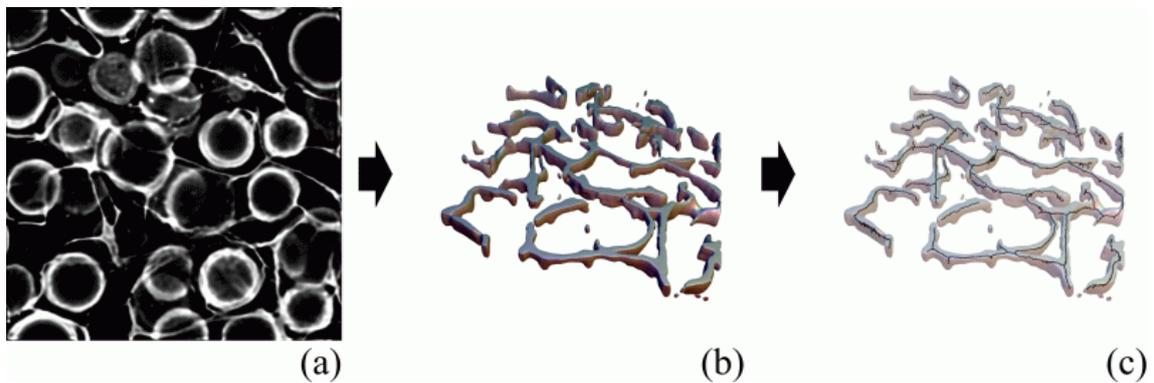


Abbildung 6.5.: Maximumprojektion (a), Oberfläche (b) und Oberfläche mit einbeschriebenem Skelett (c) der Kapillaren des Datensatzes go906uea1

In Abbildung 6.6 ist die hier beschriebene Bildverarbeitungskette noch einmal zusammengefasst.

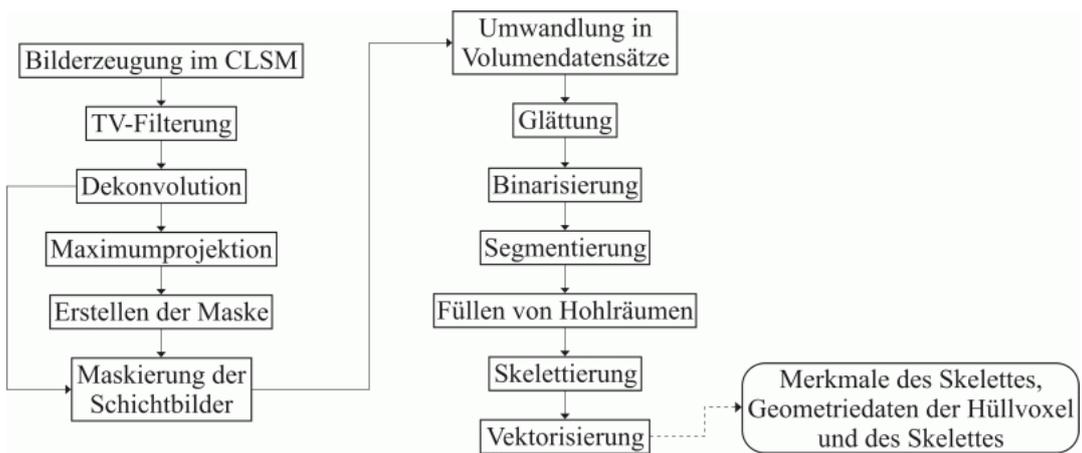


Abbildung 6.6.: Vorverarbeitung des Bildmaterials und automatische Ausmessung

Insgesamt wurden 35 Datensätze bereinigt und ausgemessen. Die Bezeichnung der Datensätze, sowie die interaktiv (L_i) und automatisch (L_a) gewonnenen Gesamtlängen der in den Datensätzen enthaltenen kapillaren Strukturen sind in Tabelle 6.4 aufgeführt.

Datensatz	L_i in μm	L_a in μm	Datensatz	L_i in μm	L_a in μm
go0906uea1	6695	7211.07	go2305uea7	4925	4887.49
go0906uea2	6979	8284.65	go2305uea8	4329	3045.23
go0906uea3	4895	4581.54	go2305uea9	4014	4026.54
go0906uea4	4717	4464.57	ho2604cd1	3765	3776.05
go0906uea7	6853	6052.55	ho2604cd2	3201	2255.75
go0906uea8	6914	7301.38	ho2604uea1	3889	3428.98
go0906uea9	2885	2361.36	ho2604uea2	3813	4029.23
go0906ueaa	7125	6867.32	ho1804cd1	6174	6720.18
go3004uea1	5261	4422.61	ho1804cd2	2610	3126.33
go3004uea2	4592	2053.08	ho1804cd3	2639	3008.41
go3004uea3	6038	6153.65	ho1804cd4	6632	6483.31
go3004uea4	6630	7611.16	ho1804cd5	7860	7857.18
go2305uea1	4623	4663.18	ho1804uea1	10964	9942.96
go2305uea2	9101	8838.06	ho1804uea2	6258	6413.99
go2305uea3	3544	3364.82	ho1804uea4	6137	6419.19
go2305uea4	5440	4782.17	ho1804uea5	5249	5507.97
go2305uea5	8390	8630.63	ho1804uea6	1995	1704.08
go2305uea6	5315	5709.47			

Tabelle 6.4.: Interaktiv und automatisch gemessene Kapillarlängen

Die automatische Ausmessung lieferte andere Längen als die interaktive Messmethode - im Mittel waren dies ca. $127 \mu\text{m}$ bzw. 3.25% weniger. Die Standardabweichung betrug hierbei $694.35 \mu\text{m}$. Der kleinste Längenunterschied lag mit $2.82 \mu\text{m}$ bei ho1804cd5 und der größte mit $2539.92 \mu\text{m}$ bei go3004uea2 vor. In Abbildung 6.7 sind die Punktwolke und die lineare Regression der interaktiv und automatisch gemessenen Kapillarlängen dargestellt.

Ausgehend vom, bei der linearen Regression berechneten, Bestimmtheitsmaß $r^2=0.895$ und somit vom Korrelationskoeffizienten $r=0.946$, kann man von einem starken linearen Zusammenhang der Kapillarlängen sprechen. Die Abweichung von automatisch und interaktiv ermittelter Kapillarlänge eines Datensatzes liegt zum einen in der Wirkungsweise des Skelettierungsalgorithmus und zum anderen im Vorhandensein eines unbestimmbaren Fehlers bei der interaktiven Ausmessung der Kapillaren begründet.

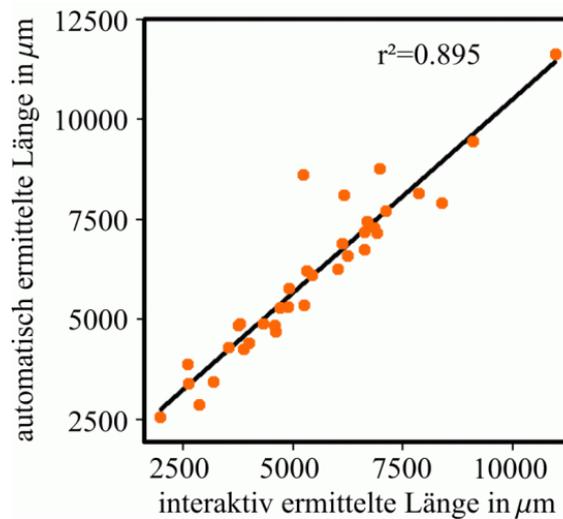


Abbildung 6.7.: Lineare Regression der interaktiv und automatisch ermittelten Kapillarlängen

Die anisotrope Skelettierung wurde auf alle Endothelstrukturen angewandt und folglich wurden auch intensitätsschwächere Abschnitte der Kapillaren mit berücksichtigt, die vom interaktiv Messenden keine Beachtung erfuhren. Desweiteren trugen die im bereinigten Datensatz verbliebenen Reste der Ringstrukturen, welche nicht mit ausmaskiert worden sind, weil sie sich oberhalb oder unterhalb einer kapillaren Struktur befanden, sowie intensitätsstarke Schnittstellen von Kapillaren und Ringstrukturen zu den ermittelten Kapillarlängen bei. Schließlich erzeugte der Skelettierungsalgorithmus das Skelett in der tatsächlichen Mitte der Endothelstrukturen. Eine wiederholte Ausmessung intensitätsstarker Kapillaren in mehreren Schichtbildern, wie sie bei der interaktiven Messung vorkommen kann, fand nicht statt.

Die in diesem Abschnitt vorgestellte Methode des manuellen Ausmaskierens und des nachfolgenden automatischen Ausmessens von Datensätzen dient lediglich dem Vergleich zur interaktiven Meßmethode, dem bisherigen Goldstandard bei der Ermittlung der Gefäßlänge in einem Gewebevolumen. Die hier verarbeiteten Datensätze sind die einzigen, bei denen eine interaktive Ausmessung vorgenommen worden ist. Heute hergestellte Gewebäquivalente bestehen, wie bereits am Anfang dieses Abschnittes erwähnt, nicht mehr aus Microcarriers als Gerüstsubstanz und machen die hier vorgestellte Methode des zeitaufwendigen Ausmaskierens überflüssig.

Die von uns entwickelte morphologisch und topologisch orientierte bildanalytische Me-

thodik kann für das hier vorliegende Bildmaterial nur begrenzt genutzt werden. Nach der aufwendigen manuellen Vorverarbeitung lassen sich lediglich Skelettierung und Vektorsierung anwenden. Bei letzterer ist für den Vergleich auch nur die Berechnung der Gefäßlänge nutzbar, da bei der interaktiven Ausmessung kein Augenmerk auf Anzahl und Art der Kreuzungen gelegt wurde. Trotz der schlechten Qualität der Schichtbilder zeigt sich eine starke Korrelation zwischen den Ergebnissen der interaktiven und der automatischen Messung von Kapillarlängen innerhalb eines Gewebevolumentens.

Kapitel 7.

Schlussfolgerung und Ausblick

Es wurde eine morphologisch und topologisch orientierte bildanalytische Methodik zur räumlich bezogenen Quantifizierung von in vitro gewachsenem Fettgewebe erarbeitet, die als Grundlage für eine spätere qualitative Bewertung von Gewebsformationen und die Optimierung von an ihrem Wachstum beteiligten Wachstumsparametern dienen kann.

Ausgehend von den optisch erfassten Schichtbildern interessanter Gewebevolumen werden im Verlauf der implementierten Bildverarbeitungskette verschiedenste Reifungsparameter extrahiert. Das Kernstück dieser Bildverarbeitungskette bildet ein sequentieller, topologieerhaltender, anisotroper 3D Skelettierungsalgorithmus. Dieser erzeugt Skelette, deren optischer Eindruck die Anwendbarkeit des Algorithmus für das gegebene Problem der Skelettierung kapillarer Strukturen nahelegt. Die Wirkungsweise aller Glieder der Bildverarbeitungskette ist in den jeweiligen Abschnitten anhand von Beispieldatensätzen verdeutlicht. Bereits existierende Algorithmen zur Berechnung der Kompaktheit sowie zur Skelettierung wurden in den entsprechenden Kapiteln vorgestellt.

Eine Visualisierung der Geometriedaten verdeutlicht die gewonnenen Ergebnisse und macht diese für den Nutzer überprüfbar. Die Bewertung der Reifungsparameter behandelt deren gewünschte Ausprägungen, ist jedoch nur als grober Anhaltspunkt für die eigentliche qualitative Bewertung von Volumendatensätzen zu sehen.

Im Ergebnisteil wurden sowohl aktuelle, als auch ältere Bildserien ausgewertet. Die Schwerpunkte lagen zum einen bei der umfassenden Quantifizierung von Endothelzellen enthaltenden Datensätzen und andererseits beim Vergleich zwischen automatischer und interaktiver Messmethode.

Insgesamt wurde die Zielstellung der Arbeit erreicht, weitere Bildserien können nun der quantitativen Auswertung zugeführt werden. Die Implementation der Bildverarbeitungskette liefert sehr gute Ergebnisse und ist als MathLink-Programm mittels Mathematica

einfach zu handhaben.

Die in Zukunft erzeugten Bildserien sollten mehr als nur 40 Schichtbilder aufweisen, da fast alle Endothelstrukturen der ausgewerteten Datensätze an den Volumengrenzen und somit nicht vollständig innerhalb des Gewebevolumentums liegen. Dies kann die Ergebnisse der Auswertung verfälschen, da die Komponenten außerhalb des betrachteten Gewebevolumentums eine völlig andere räumliche Struktur aufweisen können als innerhalb. Das betrifft zum Beispiel den Wert der Kompaktheit oder die Lage, und die daraus resultierende Gesamtlänge, des Skelettes innerhalb der Objektkomponenten. Wird ein weniger flaches Gewebevolumentum betrachtet, ist die Anzahl der in ihm vollständig enthaltenen Endothelstrukturen größer.

Es ist weiterhin wünschenswert, den Rauschanteil in den Schichtbildern zu senken, was durch zusätzliche Aufnahmen und deren Mittelung in den jeweiligen optischen Schnittebenen erreicht werden könnte. Desweiteren sind in manchen Datensätzen schwache Strukturen zu erkennen, die höchstwahrscheinlich auf eine Anlagerung der spezifischen Marker an das Trägermaterial schließen lassen, von den endothelen Strukturen aber nicht richtig zu unterscheiden sind. Damit bei der Auswertung der Endotheldatensätze auch nur die endothelen Strukturen betrachtet werden, sollte dieser Sachverhalt in den weiteren Versuchen zum Gewebewachstum und der daran anschließenden Bilderzeugung untersucht werden. Hierzu könnte ein Vergleich mit einer anderen Methode der Bilderzeugung, dem Anfertigen pathohistologischer Schnitte aus einer Gewebeprobe, hilfreich sein. Solch ein Vergleich ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch angestrebt worden, scheiterte jedoch an der Unbrauchbarkeit der erzeugten pathohistologischen Schnitte. Aus einer fluoreszenzoptisch doppelgefärbten Gewebeprobe wurden im CLSM optisch erfaßte Schichtbilder erzeugt. Anschließend wurde diese Gewebeprobe zusätzlich immunhistochemisch doppelgefärbt und Paraffinschnitte daraus angefertigt. Aufgrund der sehr weichen Konsistenz der Gewebeprobe rissen die Gewebsformationen beim Schneiden auseinander.

Sollten zukünftige Gewebevolumentum ein vollständig ausgebildetes Netzwerk aufweisen, so ist es sinnvoll noch weitere, in dieser Arbeit nicht betrachtete Reifungsparameter zu extrahieren. So könnte zum Beispiel eine fraktale Analyse der Kapillaren Aufschluß über ihr Verzweigungsverhalten geben und anhand von Strömungsmodellen die Güte ihrer inneren Lumen untersucht werden.

Kapitel 8.

Literaturverzeichnis

- [AS 1984] M. Abramowitz, I. Stegun. „Handbook of Mathematical Functions“. Verlag Harri Deutsch, Frankfurt/Main, 1984.
- [BA 1994] G. Bertrand, Z. Aktouf. „A 3D thinning algorithm using subfields“. In Proceedings, SPIE Conference on Vision Geometry III, Vol. 2356:113-124, 1994.
- [BCMw 1997] P. Blomgren, T. F. Chan, P. Mulet, C.K. Wong. “Total Variation Image Restoration: Numerical Methods and Extensions“. In IEEE image proc. Proceedings of the 1997 IEEE International Conference on Image Processing, October 1997.
- [BKJMRP 2002] E. M. Brey, T. W. King, C. Johnston, L. V. McIntire, G. P. Reece, C. W. Patrick jr. „A Technique for Quantitative Three-Dimensional Analysis of Microvascular Structure“. In Microvascular Research 63:279-294, 2002.
- [Blu 1967] H. Blum. „A transformation for extracting new descriptors of shape“. In Models for the Perception of Speech and visual form, MIT Press, Cambridge, MA, 1967.
- [BM 1992] G. Bertrand, G. Malandain. „Fast Characterization of 3D Simple Points“. In International Conference on Pattern Recognition, pages 232-235, The Hague, Netherlands, 1992.

- [BM 1994] G. Bertrand, G. Malandain. „A new characterization of three-dimensional simple points“. In *Pattern Recognition Letters* 15:169-175, 1994.
- [Bor 1984] G. Borgefors. „Distance transformations in arbitrary dimensions“. In *Computational Vision Graphics Image Processing* 27:321-345, 1984.
- [Bri 2000] E. Bribiesca. „A Measure of Compactness for 3D Shapes“. In *Computers and Mathematics with Applications*, 40:1275-1284, 2000.
- [FKLM 2000] B. Frerich, J. Kurtz-Hoffmann, N. Lindemann, S. Müller. „Untersuchungen zum Tissue engineering vaskularisierter knöcherner und weichgewebiger Transplantate“. *Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie* 4 Suppl 2:S490-2495, 2000.
- [GB 1990] W. X. Gong, G. Bertrand. „A simple parallel 3D thinning algorithm“. In *International Conference on Pattern Recognition*, pages 188-190, 1990.
- [GH 1994] A. Gueziec, R. Hummel. „The wrapper algorithm: surface extraction and simplification“. In *IEEE workshop on biomedical image analysis*, San Francisco, CA, June 1994.
- [Has 1955] C. Hastings, Jr.. „Approximations for digital computers“. Princeton University Press, Princeton, N.J., 1955.
- [KF 2002] J.-P. Kuska, B. Frerich. „Nichtlineare Diffusionssysteme und ihre Anwendung zur Bewertung von dreidimensionalen Gewebekulturen“. 2002.
- [Kus 2004] J.-P. Kuska. MathGL3d Homepage. <http://phong.informatik.uni-leipzig.de/kuska/mathgl3dv3/index.htm>
- [KVVV 1997] G. M. P. van Kempen, L. J. van Vliet, P. J. Verveer, H. T. M. van der Voort. „A quantitative comparison of image restoration methods for confocal microscopy“. In *Journal of Microscopy*, 185:354-365, 1997.

- [LB 2001] C. Lohou, G. Bertrand. „A new 3D 12-subiteration thinning algorithm based on P-simple points“. IWCIA Preliminary Version, 2001.
- [LC 1987] W. E. Lorensen, H. E. Cline. „Marching cubes: a high resolution 3D surface construction algorithm“. In *Computer Graphics*, 21:163-169, 1987.
- [Lev 1988] M. Levoy. „Display of Surfaces from Volume Data“. In *IEEE Computer Graphics and Applications*, Vol. 8, No. 3, May, 1988.
- [Loh 1998] G. Lohmann. „Volumetric Image Analysis“. John Wiley and Sons Ltd., West Sussex and B. G. Teubner, Stuttgart, 1998.
- [Luc 1974] L. B. Lucy. „An iterative technique for rectification of observed distributions“. In *The Astronomical Journal* 79, 6:745-765, 1974.
- [LVG 1980] S. Lobregt, P. W. Verbeek, F. C. A. Groen. „Three-Dimensional Skeletonization: Principle and Algorithm“. In *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 2:75-77, 1980.
- [MS 1996] C. Min Ma, M. Sonka. „A Fully Parallel Thinning Algorithm and Its Application“. In *Computer Vision, Graphics and Image Processing: Image Understanding*, 64(3): 420-433, 1996.
- [Par 1997] J. R. Parker. „Algorithms for Image Processing and Computer Vision“. John Wiley and Sons Inc., N. Y., 1997.
- [PK 1998] K. Palágyi, A. Kuba. „A 3D 6-subiteration thinning algorithm for extracting medial lines“. In *Pattern Recognition Letters*, 19:613-627, 1998.
- [PK 1999] K. Palágyi, A. Kuba. „A Parallel 3D 12-Subiteration Thinning Algorithm“. In *Graphical Models and Image Processing*, 61:199-221, 1999.

- [Ric 1972] W. H. Richardson. „Bayesian-based iterative method of image restoration“. In *Journal of Optical Society of America*, 62:55-59, 1972.
- [Sri 1981] S. N. Srihari. „Representation of Three-Dimensional Images“. In *Computing Surveys*, Vol.13, No.4, December 1981.
- [ST 1995] T. Saito, J. Toriwaki. „A sequential thinning algorithm for three-dimensional digital pictures using the Euclidean distance transformation“. In *Proceedings of the 9th Scandinavian Conference on Image Analysis (SCIA'95)*, pages 507-516, 1995.
- [TF 1981] Y. F. Tsao, K. S. Fu. „A Parallel Thinning Algorithm for 3-D Pictures“. In *Computer Graphics and Image Processing*, 17:315-331, 1981.
- [WGGH 2000] S. Wilhelm, B. Gröber, M. Gluch, H. Heinz. „Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie“. Carl Zeiss, Jena, 2000.
- [Züc 2004] K. Zückmantel. Zahnmedizinische Dissertation. 2004.

Anhang A.

Implementationen

Die in dieser Arbeit vorgestellte Bildverarbeitungskette ist in Form eines Mathematica-Notebooks auf dem beiliegenden Datenträger zu finden. Dieses Notebook beinhaltet alle in Mathematica implementierten Einzelschritte sowie die Einbindung dreier MathLink-Programme: **CapilarML**, **Bedeckungsgrad** und **TopoSkel**. **CapilarML** ist ein Programm, welches das gekoppelte anisotrope nichtlineare Reaktionsdiffusionssystem realisiert, mit dem die Glättung und Ausheilung der Volumendatensätze stattfand. Es wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Jens-Peer Kuska zur Verfügung gestellt. Die Bedienung der zwei MathLink-Programme **Bedeckungsgrad** und **TopoSkel** ist in den folgenden beiden Abschnitten ausführlich beschrieben, ihr Quellcode befindet sich ebenfalls auf dem beiliegenden Datenträger.

A.1. Das MathLink-Programm Bedeckungsgrad

Um den Grad der Bedeckung zu berechnen, wurde ein MathLink-Programm in C++ entwickelt, welches in Mathematica eingebunden werden kann. Der Aufruf **Bedeckungsgrad[nx, ny, nz, N[Flatten[CapilarData]], N[Flatten[MuscleData]], options]** liefert als Ergebnis eine Liste mit Schwellwerten und den entsprechenden Bedeckungsgraden.

A.1.1. Programmbenutzung

Nachdem das MathLink-Programm **Bedeckungsgrad** in Mathematica eingebunden worden ist, kann es mit folgenden Parametern aufgerufen werden:

Parameter → Wertebereich	Beschreibung
$nx, ny, nz \rightarrow Integer$	Voxelanzahl der übergebenen Datensätze in den jeweiligen Dimensionen.
$CapilarData \rightarrow Real$	Zu untersuchender Endotheldatensatz.
$MuscleData \rightarrow Real$	Entsprechender Muskeldatensatz.
$Start \rightarrow Real$	Anfangsschwellwert zum Berechnen des Bedeckungsgrades.
$Steps \rightarrow Integer$	Anzahl der zu berechnenden Bedeckungsgrade.
$Stepsize \rightarrow Real$	Schrittweite zur Erhöhung des Schwellwertes.

Tabelle A.1.: Parameter des MathLink-Programmes Bedeckungsgrad

Bedeckungsgrad[$nx, ny, nz, N[\text{Flatten}[CapilarData]], N[\text{Flatten}[MuscleData]], Start \rightarrow Real, Steps \rightarrow Integer, Stepsize \rightarrow Real$]

Eine genauere Beschreibung dieser Parameter ist in Tabelle A.1 zu finden.

A.1.2. Programmausgabe

Nachdem die Berechnung der Bedeckungsgrade abgeschlossen wurde, gibt das Programm das Ergebnis in Form einer verschachtelten Liste an Mathematica zurück. Diese Liste enthält Paare von Schwellwerten und entsprechenden Bedeckungsgraden und ist dem Schwellwert nach aufsteigend geordnet.

A.2. Das MathLink-Programm TopoSkel

Der in dieser Arbeit vorgestellte 3D-Skelettierungsalgorithmus wurde zusammen mit anderen Algorithmen, wie zum Beispiel dem Marching Tetrahedron Algorithmus und der Vektorisierung, in C++ implementiert und kann als MathLink-Programm in Mathematica eingebunden werden.

Der Aufruf von **Toposkel[$nx, ny, nz, pnx, pny, pnz, N[\text{Flatten}[Data]], options$]** gibt die skelettierte Version eines Volumendatensatzes mit den Dimensionen nx, ny und nz sowie verschiedene Reifungsparameter in Abhängigkeit der verwendeten Optionen zurück.

TopoSkel bereitet die Ausgabe der Geometriedaten so auf, dass sie mit dem MathGL3d-Viewer [Kus 2004] visualisiert werden können.

A.2.1. Programmbenutzung

Nachdem das MathLink-Programm **TopoSkel** in Mathematica eingebunden worden ist, kann es mit folgenden Parametern aufgerufen werden:

Toposkel[*nx*, *ny*, *nz*, *pnx*, *pny*, *pnz*, *N*[*Flatten*[*Data*]], *Threshold* → **Real**, *Sigma* → **Real**, *SecondThreshold* → **Real**, *Adaptiv* → **Integer**, *Fill* → **Integer**, *Skeletonize* → **Integer**, *Lines* → **Integer**, *Polygonize* → **Integer**]

Eine genauere Beschreibung dieser Parameter ist in Tabelle A.2 zu finden.

Als Beispiel sei im Folgenden der Aufruf von **TopoSkel** zur Analyse des Endotheldatensatzes der Perfusionsserie 09 angeführt:

Toposkel[512, 512, 512, 1.56, 1.56, 1.54, *N*[*Flatten*[*Data*]], *Threshold* → 3.1, *Sigma* → 0, *SecondThreshold* → 0, *Adaptiv* → 0, *Fill* → 1, *Skeletonize* → 2, *Lines* → 1, *Polygonize* → 1]

A.2.2. Programmausgabe

Das Ergebnis von **TopoSkel** wird in Form einer verschachtelten Liste an Mathematica zurück gegeben. Der Aufbau dieser aus sieben Unterlisten bestehenden Liste ist wie folgt:

```
{ { { #Voxel, { nx, ny, nz } }, { Gesamtvolumen, { nx*pnx, ny*pny, nz*pnz } }, { Threshold, { Sigma, SecondThreshold, Adaptiv } }, { Fill, Skeletonize, Lines, Polygonize } }, { #HK, #OK }, { { { #Voxel, V, A, C }1.OK, ... }, { #Voxel, V, A,  $\emptyset$ gC }ges }, { Geometriedaten Oberfläche }, { Geometriedaten Hülle }, { Geometriedaten Skelett }, { { { L, #Linienzüge, #Endpunkte, #Kreuzungspunkte { { 3, #3er } , ... , { 12, #12er } } }1.OK, ... }, { L, #Linienzüge, #Endpunkte, #Kreuzungspunkte { { 3, #3er } , ... , { 12, #12er } } }ges } } }
```

Im ersten Teil werden alle Parameter ausgegeben, mit denen **TopoSkel** aufgerufen wurde. Somit sind, neben den eigentlichen Ergebnissen, auch gleich die Werte der zur Berechnung genutzten Parameter mit verfügbar. Daran anschließend ist die Anzahl der Objekt-

Parameter → Wertebereich	Beschreibung
$nx, ny, nz \rightarrow Integer$	Anzahl der Voxel des übergebenen Datensatzes in den jeweiligen Dimensionen.
$pnx, pny, pnz \rightarrow Real$	Abmessungen der Voxel in den jeweiligen Dimensionen.
$Data \rightarrow Real$	Das zu behandelnde reellwertige Volumen.
$Threshold \rightarrow Real$	Der Schwellwert θ klassifiziert die Voxel im Datensatz in Objekt- oder Hintergrundvoxel. Falls der Datensatz adaptiv binarisiert werden soll, dient dieser Parameter als Basisschwellwert.
$Sigma \rightarrow Real$	Dieser Parameter gibt den Wert σ für das adaptive Schwellwertverfahren an.
$SecondThreshold \rightarrow (-1, \dots, 1)$	Dieser Wert für den zweiten Schwellwert θ_2 wird ebenfalls für das adaptive Schwellwertverfahren benötigt, der reellwertige Wertebereich reicht von -1 bis 1 .
$Adaptiv \rightarrow (0/1)$	Wird der Parameter auf 1 gesetzt, erfolgt die Binarisierung des Volumens unter Verwendung des vorher beschriebenen adaptiven Schwellwertverfahrens, bei 0 wird das Volumen mit einem festen Schwellwert binarisiert.
$Fill \rightarrow (0/1)$	Bei 1 werden im Datensatz eventuell vorhandene Hohlräume nach der Binarisierung gefüllt, um bei der Skelettierung keine Artefakte zu hinterlassen, 0 übergeht diesen Schritt.
$Skeletonize \rightarrow (0, 1, 2)$	0 übergeht die Skelettierung des Volumens, 1 skelettiert das Volumen und 2 gibt zusätzlich die Hüllvoxel aller Objektkomponenten mit aus.
$Lines \rightarrow (0/1)$	Setzt man den Parameter auf 0 , wird das abschließende Vektorisieren des Datensatzes übergangen und das Skelett wird in Form von unverbundenen Punkten ausgegeben, 1 vektorisiert das Skelett.
$Polygonize \rightarrow (0/1)$	Bei 1 werden die Oberflächendreiecke der Komponenten ausgegeben, 0 übergeht diese Ausgabe.

Tabelle A.2.: Parameter des MathLink-Programmes TopoSkel

und Hintergrundkomponenten angegeben. In der nächsten Liste werden die Anzahl der Voxel, das Volumen, die Oberfläche und die Kompaktheit für jede einzelne Komponente getrennt aufgeführt, sowie im Anschluss diese Werte für alle Komponenten zusammen. Im vierten Teil folgen die Geometriedaten der Oberfläche, danach sämtliche Hüllvoxel und schließlich das Skelett. Im letzten Teil der ausgegebenen Liste werden für jede Komponente die Gesamtlänge des Skelettes, die Anzahl der Linienzüge, End- und Kreuzpunkte sowie die Anzahl der jeweiligen Kreuzungsarten ausgegeben und danach diese Daten für das gesamte Skelett.

Als Beispiel sei an dieser Stelle die Ausgabe von **TopoSkel** bezüglich der Analyse des Endotheldatensatzes der Perfusionsserie 09 angeführt:

```
{ { { 10485760, { 512, 512, 512 } } , { 39297944.13, { 798.72, 798.72, 61.6 } } , { 3.1, { 0, 0, 0 } } , { 1, 2, 1, 0 } } , { 2, 227 } , { { { 16, 8.59, 62.65, 0.0339 }1.OK , ... } , { 1345604, 4959003.15, 878566.64, 0.0615 }ges } , { { Polygon[ { { 10.9883, 10., 6.01168 } , { 10., 10.9883, 6.01168 } , { 10.4942, 10.4942, 7. } } ] , ... } } , { { Point[ { 800.28, 800.28, 41.58 } ] , ... } } , { { Line[ { { 800.28, 597.48, 56.98 } , { 800.28, 599.04, 55.44 } } ] , ... } } , { { { 1.56, 1, 2, 0 { { 3, 0 } , ... , { 12, 0 } } }1.OK , ... } , { 13408.4, 753, 633, 290 { { 3, 287 } , { 4, 3 } , ... , { 12, 0 } } }ges } }
```

Anhang B.

Datensätze

In diesem Teil des Anhanges befinden sich die Abbildungen und Tabellen aller 22 analysierten Bildserien. Für jede Bildserie sind die Maximumprojektionen von Endothel- und Muskeldatensatz sowie die im Rahmen der implementierten Bildverarbeitungskette ermittelte Oberfläche und das Skelett des Endotheldatensatzes abgebildet. Die Angabe aller, einen Endotheldatensatz charakterisierenden Reifungsparameter ermöglicht einen umfassenden Überblick über die Eigenschaften dieser Datensätze. Neben den Reifungsparametern wurden zusätzlich noch die Daten ihrer jeweils zehn größten Komponenten aufgelistet. Auf dem der Arbeit beiliegenden Datenträger befinden sich die kompletten Ergebnisdateien, denen alle im Folgenden genannten Daten entnommen sind.

Anfangsserie 01

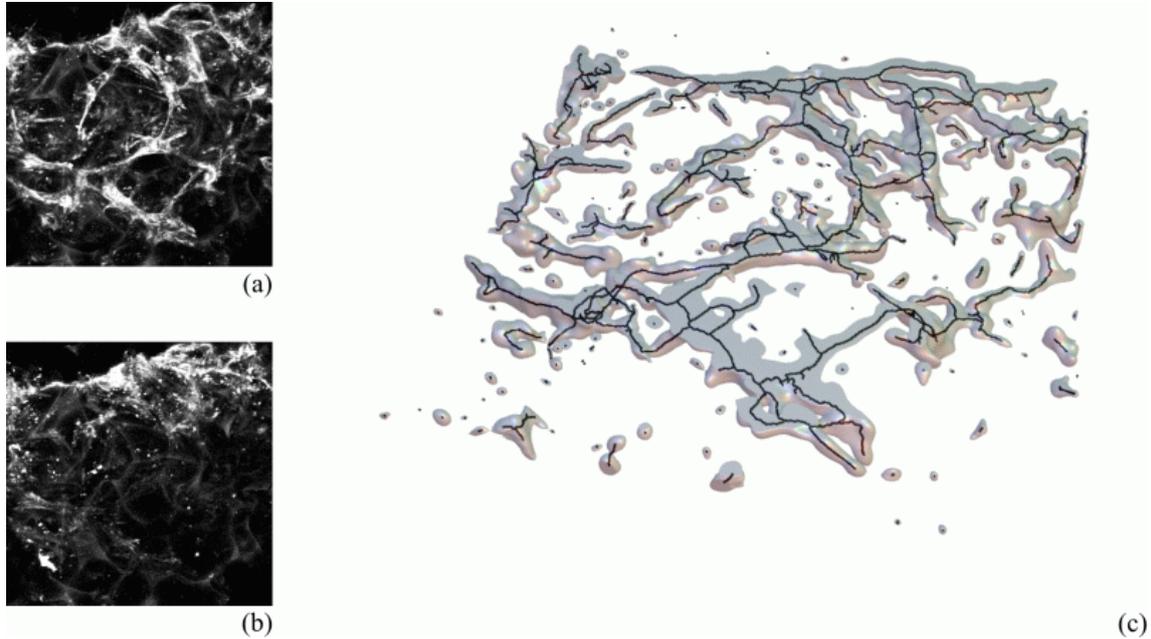


Abbildung B.1.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endothel-datensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endothel-datensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	4.5
Objektkomponenten	138	Bedeckungsgrad	26.43%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	2	Linienzüge im Skelett	523
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	12.07%	Endpunkte im Skelett	408
Gesamtoberfläche der Komponenten	813229.48 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	211
Gesamtvolumen der Komponenten	4742758.99 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	206/5/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.074	Gesamtlänge des Skelettes	12031.87 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endothel-datensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
938326	3469706.06	544557.96	0.0084	8835.23	302	102	166	162	4
69386	254327.19	35701.47	0.1608	537.03	35	18	17	16	1
56487	208179.71	36600.85	0.1	584.31	21	9	11	11	0
48270	179126.11	24548.48	0.2453	195.25	5	4	2	2	0
42112	155727.83	24428.81	0.1881	230.49	5	4	2	2	0
13504	50668.29	9196.85	0.3733	94.39	3	3	1	1	0
12033	43649.36	12484.98	0.1107	219.46	3	3	1	1	0
11714	41914.83	11980.93	0.1155	210.33	7	5	3	3	0
7219	26820.68	6467.85	0.3007	69.13	5	4	2	2	0
7503	26028.96	8044.54	0.1472	151.93	5	4	2	2	0

Anfangsserie 02

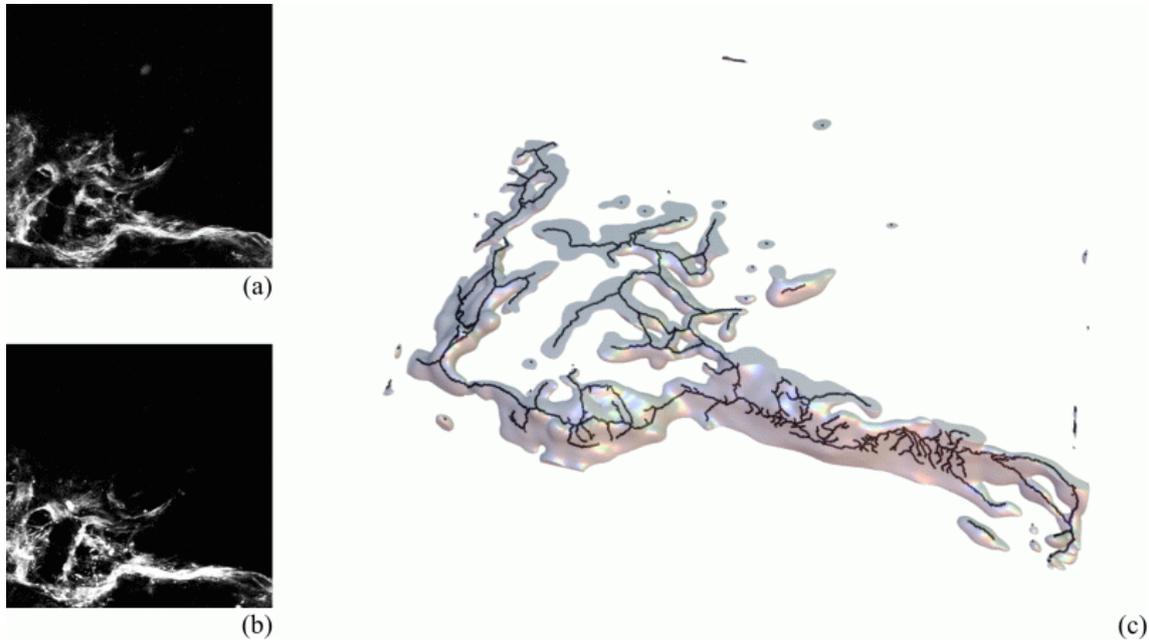


Abbildung B.2.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endothel-datensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endothel-datensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	4.5
Objektkomponenten	33	Bedeckungsgrad	58.74%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	1	Linienzüge im Skelett	342
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	4.36%	Endpunkte im Skelett	199
Gesamtoberfläche der Komponenten	315928.66 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	161
Gesamtvolumen der Komponenten	1712810.28 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	159/2/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.0353	Gesamtlänge des Skelettes	5879.9 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endothel-datensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
413484	1523783.12	263575.25	0.0143	5158.27	291	130	150	148	2
31595	114667.92	27636.75	0.0704	496.93	22	11	11	11	0
12023	44710.9	8188.94	0.4117	31.98	1	2	0	0	0
1986	7209.96	2145.08	0.5956	32.99	1	2	0	0	0
1869	6251.55	2621.82	0.2453	36.45	1	2	0	0	0
785	2707.05	1038.04	0.741	2.19	1	2	0	0	0
847	2640.12	1636.00	0.18	1.56	1	2	0	0	0
641	2028.06	1162.88	0.2958	2.21	1	2	0	0	0
549	1707.93	1044.35	0.2896	1.56	1	2	0	0	0
410	1481.66	752.17	0.5835	1.54	1	2	0	0	0

Anfangsserie 03

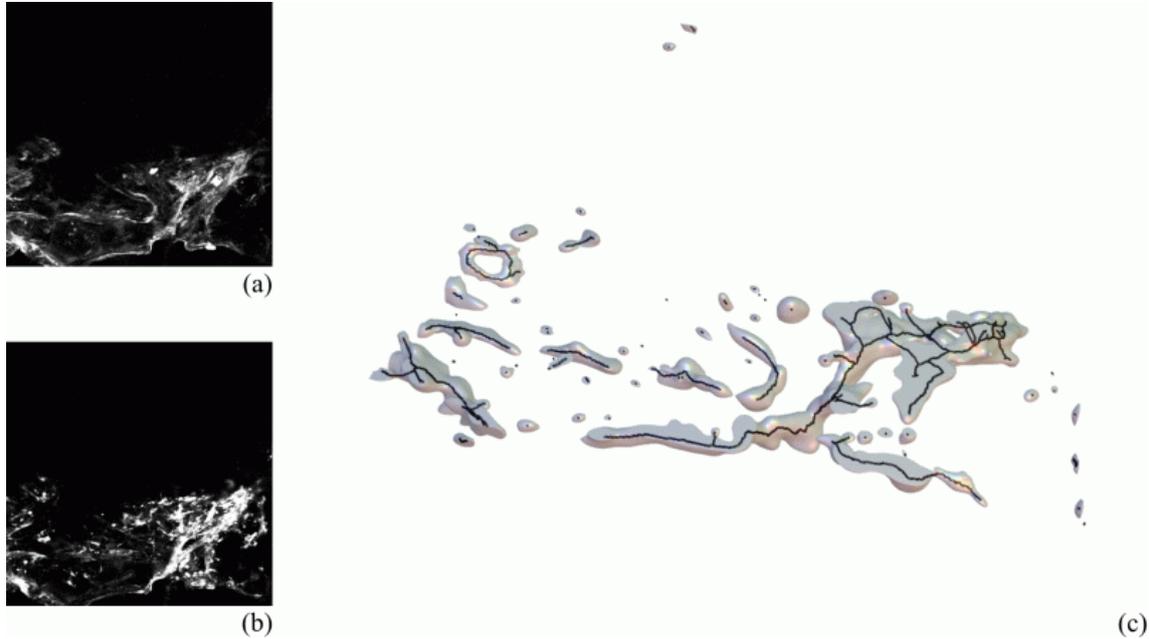


Abbildung B.3.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endothel-datensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endothel-datensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	4.5
Objektkomponenten	63	Bedeckungsgrad	53.04%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	1	Linienzüge im Skelett	151
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	3.33%	Endpunkte im Skelett	160
Gesamtoberfläche der Komponenten	238411.63 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	47
Gesamtvolumen der Komponenten	1307787,6 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	46/1/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.1358	Gesamtlänge des Skelettes	3131.07 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endothel-datensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
205544	760384.96	111980.97	0.0466	1614.71	67	28	35	34	1
53752	198808.94	30186.35	0.1625	367.3	17	10	8	8	0
16835	61577.88	13721.87	0.166	215.1	3	3	1	1	0
14054	52333.24	10738.33	0.2501	118	1	2	0	0	0
11327	40504	10640.07	0.154	168.27	3	3	1	1	0
10595	38751.91	8264.27	0.3009	108.46	1	2	0	0	0
8576	31504.08	9937.98	0.1144	217.06	4	2	2	2	0
6860	24396.89	6564.47	0.238	90.75	1	2	0	0	0
6462	23940.14	4409.67	0.7559	2.21	1	2	0	0	0
4236	14844.8	4082.06	0.3664	15.44	1	2	0	0	0

Anfangsserie 05

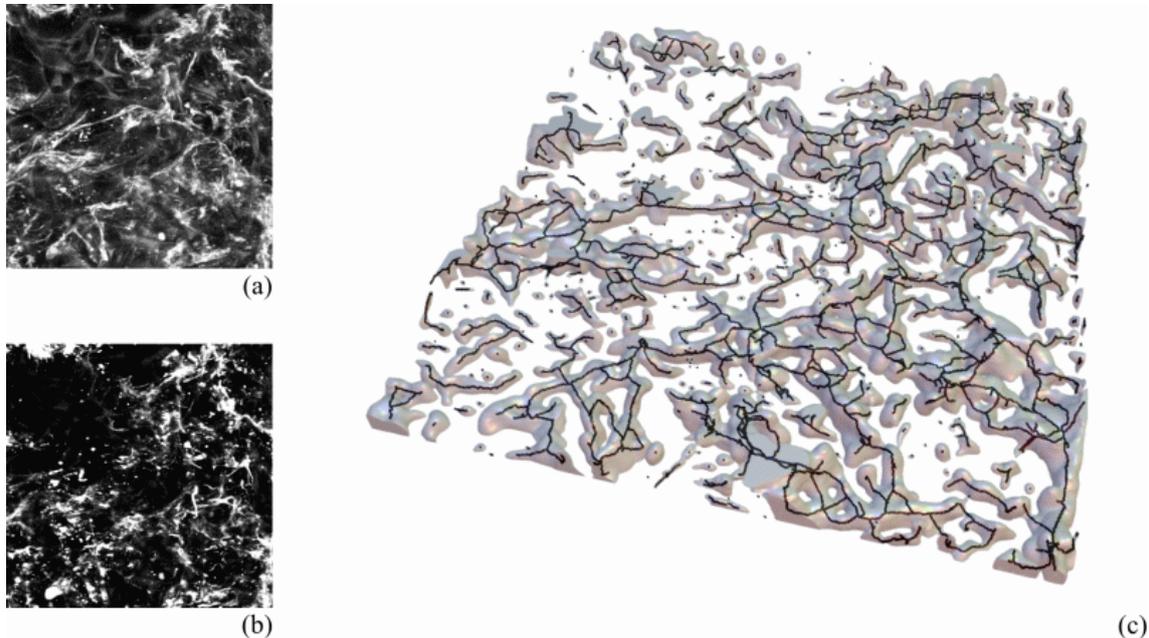


Abbildung B.4.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endothel-datensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endothel-datensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	4.5
Objektkomponenten	307	Bedeckungsgrad	25.38%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	1	Linienzüge im Skelett	1346
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	17.94%	Endpunkte im Skelett	973
Gesamtoberfläche der Komponenten	1362251.58 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	568
Gesamtvolumen der Komponenten	7050713.37 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	555/13/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.0536	Gesamtlänge des Skelettes	24010.18 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endothel-datensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
1564207	5740045.04	994265.67	0.0038	18676.03	921	330	499	486	13
47117	173086.55	28697.16	0.1434	431.1	16	8	8	8	0
41494	154218.91	24536.94	0.1821	369.13	16	8	8	8	0
35887	129452.11	31203.92	0.0624	591.48	25	11	13	13	0
22743	83723.21	19276.32	0.1107	380.7	16	8	8	8	0
16225	57485.22	11591.18	0.24	121.69	6	3	3	3	0
10654	39090.94	8646.52	0.2674	113.31	5	4	2	2	0
10306	36405.52	11188.73	0.107	211.88	5	4	2	2	0
9530	35131.89	8471.02	0.2296	112.28	3	3	1	1	0
8473	30354.42	9062.81	0.14	147.43	1	2	0	0	0

Anfangsserie 06

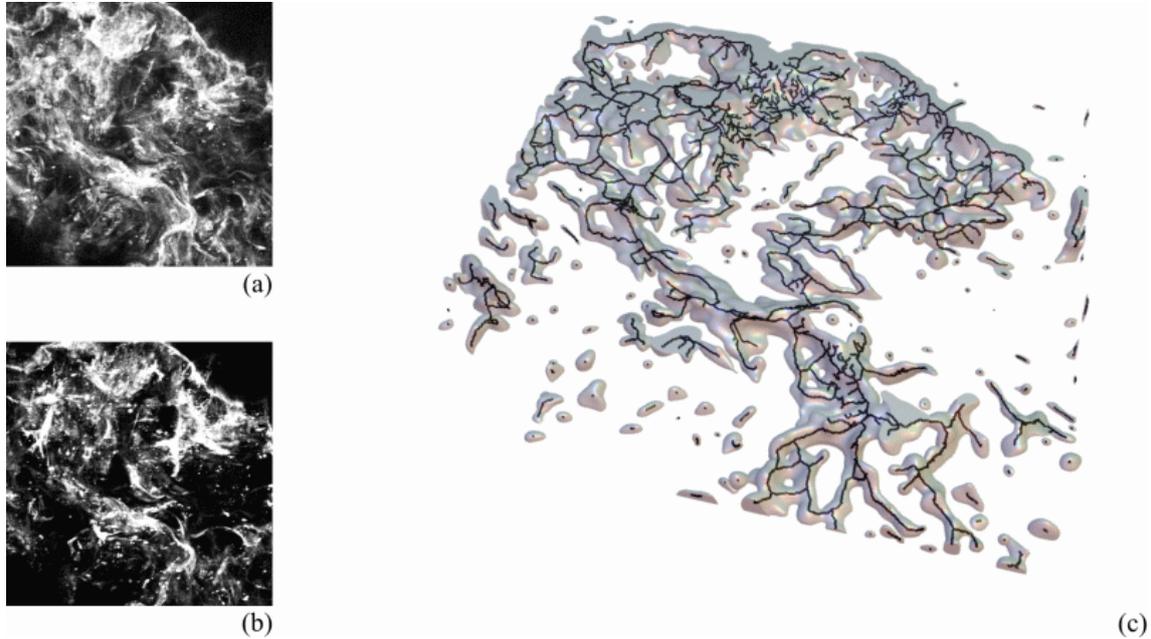


Abbildung B.5.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endothel-datensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endothel-datensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	13.5
Objektkomponenten	111	Bedeckungsgrad	26.82%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	1	Linienzüge im Skelett	1137
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	13.37%	Endpunkte im Skelett	625
Gesamtoberfläche der Komponenten	923785.45 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	546
Gesamtvolumen der Komponenten	5254120.43 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	535/11/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.0364	Gesamtlänge des Skelettes	17923.26 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endothel-datensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
1278972	4729066.86	758020.47	0.0058	15779.64	977	389	518	507	11
27311	99285.56	23344.95	0.0876	478.44	27	9	15	15	0
13056	48735.37	12305.67	0.1442	212.58	9	6	4	4	0
11786	42173.36	9856.04	0.2101	109.28	1	2	0	0	0
7083	26522.18	6949.65	0.237	142.64	7	5	3	3	0
6797	25166.07	6230.41	0.2962	76.65	3	3	1	1	0
6778	24295.52	5387.67	0.4269	26.84	1	2	0	0	0
6713	23799.75	6858.14	0.1986	124.55	3	3	1	1	0
5434	18995.71	5693.39	0.2211	99.55	5	4	2	2	0
4567	17076.71	4538.37	0.3528	62.58	1	2	0	0	0

Kontrollserie 01

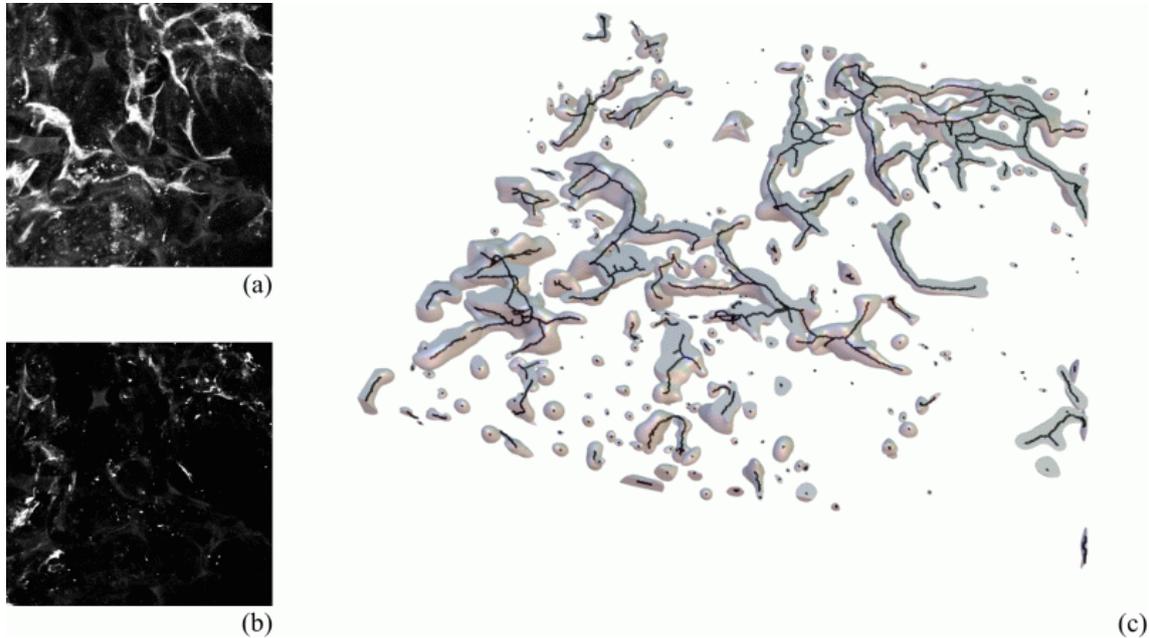


Abbildung B.6.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endothel-datensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endothel-datensatzes:

betrachtetes Gewebevolument	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	4.5
Objektkomponenten	222	Bedeckungsgrad	13.42%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	2	Linienzüge im Skelett	463
von Endothelzellen belegtes Gewebevolument	9.36%	Endpunkte im Skelett	518
Gesamtoberfläche der Komponenten	708446.1 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	136
Gesamtvolumen der Komponenten	3679716.54 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	136/0/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.1471	Gesamtlänge des Skelettes	9398.52 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endothel-datensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
258125	952087.10	164928.58	0.0229	2648.17	69	24	38	38	0
145360	537923.19	75034.93	0.0775	920.01	26	13	13	13	0
116575	429376.73	65106.62	0.0756	874.57	36	15	19	19	0
99088	366841.03	61385.33	0.0658	920.20	22	11	11	11	0
76900	285009.56	51839.28	0.0659	828.72	47	16	26	26	0
31213	117363.40	21893.43	0.1484	304.70	5	4	2	2	0
22999	84537.33	17856.30	0.1420	244.21	1	2	0	0	0
22014	81791.48	14798.17	0.2335	232.95	7	5	3	3	0
18713	68722.96	12466.25	0.2757	131.29	5	4	2	2	0
17999	66858.23	12769.85	0.2428	153.83	8	4	4	4	0

Kontrollserie 02

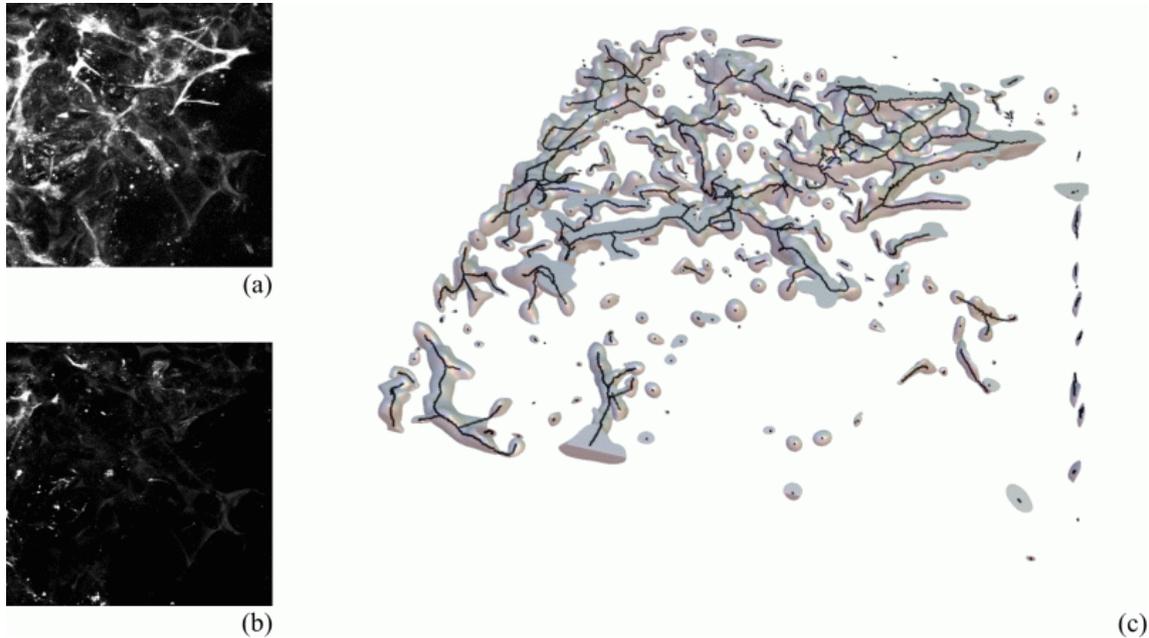


Abbildung B.7.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endothel-datensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endothel-datensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	4.5
Objekt-komponenten	204	Bedeckungsgrad	3.53%
Hintergrund-komponenten vor dem Füllen	1	Linienzüge im Skelett	535
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	10.74%	Endpunkte im Skelett	528
Gesamtoberfläche der Komponenten	773336.78 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	179
Gesamtvolumen der Komponenten	4219432.2 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	174/5/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.0979	Gesamtlänge des Skelettes	10461.71 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endothel-datensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
473256	1751732.97	271990.05	0.0172	3893.83	154	61	81	77	4
370945	1385283.95	198562.72	0.0277	3069.53	119	45	64	63	1
34429	124339.57	25445.27	0.1061	378.05	7	5	3	3	0
31883	116598.56	24810.44	0.1007	308.93	9	6	4	4	0
28816	106316.30	18943.79	0.1880	193.65	7	5	3	3	0
17896	63686.79	17209.78	0.0900	288.07	9	6	4	4	0
11884	43283.15	11582.14	0.1364	187.39	9	3	5	5	0
10976	40692.20	7854.51	0.3865	73.39	3	3	1	1	0
10410	39026.83	8433.34	0.2872	108.92	6	3	3	3	0
9483	34731.41	7740.48	0.2942	96.43	3	3	1	1	0

Kontrollserie 03

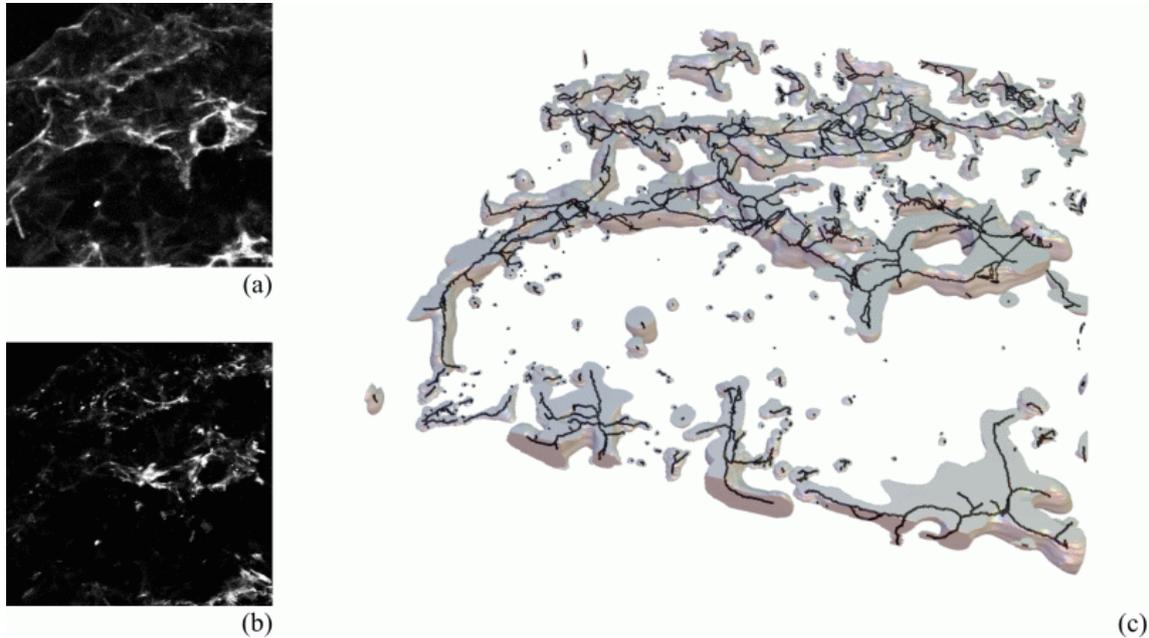


Abbildung B.8.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endothel-datensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endothel-datensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	1.1
Objektkomponenten	366	Bedeckungsgrad	17.89%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	8	Linienzüge im Skelett	1180
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	14.72%	Endpunkte im Skelett	956
Gesamtoberfläche der Komponenten	1033481.88 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	460
Gesamtvolumen der Komponenten	5786538.79 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	444/16/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.0452	Gesamtlänge des Skelettes	16348.22 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endothel-datensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
1123330	4237853.25	621729.38	0.0085	10186.19	584	180	324	312	12
127595	469977.92	61900.08	0.1053	797.93	32	13	17	17	0
62109	229681.76	36672.61	0.1210	562.87	24	14	11	10	1
36615	136682.53	30713.76	0.0729	463.65	24	9	13	13	0
30451	116285.43	22265.70	0.1385	248.77	12	6	6	6	0
21163	84128.43	21616.87	0.0792	318.56	20	8	10	10	0
17918	67399.19	11365.47	0.3499	135.55	7	5	3	3	0
10297	40230.35	13122.15	0.0810	260.94	17	6	9	8	1
8642	35245.38	14137.21	0.0497	394.36	30	5	18	17	1
9047	33720.07	5924.73	0.6183	12.71	1	2	0	0	0

Kontrollserie 04

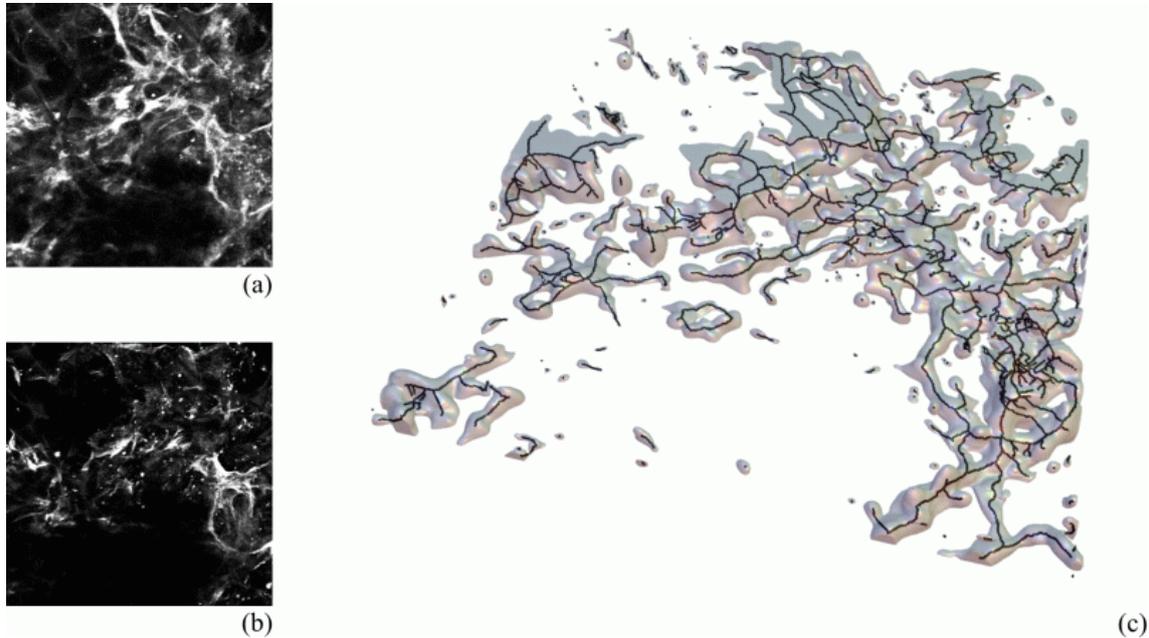


Abbildung B.9.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endothel-datensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endothel-datensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	3.7
Objektkomponenten	185	Bedeckungsgrad	16.56%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	1	Linienzüge im Skelett	898
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	13.81%	Endpunkte im Skelett	599
Gesamtoberfläche der Komponenten	909314.81 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	395
Gesamtvolumen der Komponenten	5428483.71 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	387/8/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.036	Gesamtlänge des Skelettes	16027.37 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endothel-datensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
1208345	4459207.49	663192.05	0.0077	11922.68	583	208	316	308	8
95116	346427.48	54443.11	0.0841	868.00	36	15	19	19	0
44888	158861.62	41058.97	0.0412	953.48	26	10	14	14	0
40359	144696.96	28285.01	0.1046	414.31	21	12	10	10	0
14341	52596.65	11582.63	0.2013	154.72	12	6	6	6	0
10265	35751.07	10763.61	0.1159	191.00	4	2	2	2	0
7650	27327.42	6896.34	0.2575	84.71	3	3	1	1	0
5256	19609.00	4007.25	0.6758	13.86	1	2	0	0	0
5313	18705.91	5506.91	0.2370	78.52	1	2	0	0	0
4318	15672.99	6038.14	0.1262	249.62	33	6	20	20	0

Kontrollserie 05

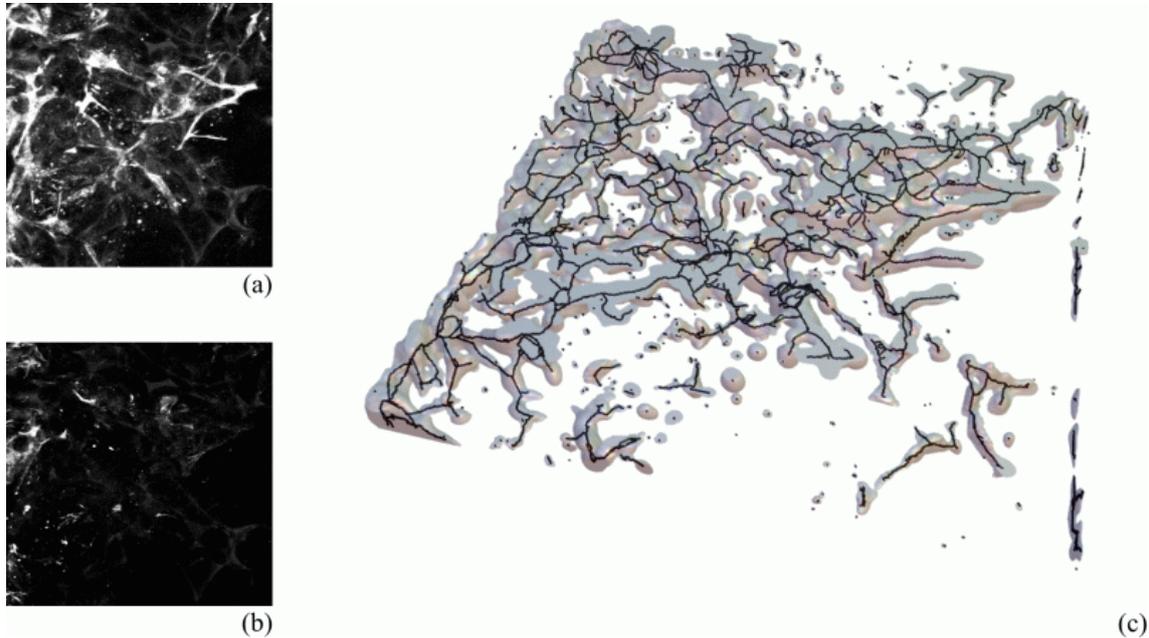


Abbildung B.10.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	2.1
Objektkomponenten	365	Bedeckungsgrad	3.97%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	2	Linienzüge im Skelett	1368
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	18.36%	Endpunkte im Skelett	995
Gesamtoberfläche der Komponenten	1268602.53 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	575
Gesamtvolumen der Komponenten	7214195.79 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	563/12/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.0282	Gesamtlänge des Skelettes	22635.53 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
1722429	6384615.00	985758.65	0.0048	17692.19	862	261	484	475	9
45109	166011.69	33012.19	0.0866	587.95	32	14	16	14	2
24941	91615.19	27589.56	0.0452	566.42	27	6	16	16	0
21946	81416.53	21483.22	0.0756	395.47	30	12	16	16	0
19852	72694.19	17709.21	0.1076	314.92	16	8	8	8	0
11837	42120.12	12163.00	0.1115	196.69	7	5	3	3	0
8587	30507.60	9025.37	0.1432	170.48	6	3	3	3	0
7169	26526.67	7512.75	0.1877	122.35	6	5	2	1	1
6190	23022.54	8362.95	0.1025	212.02	5	4	2	2	0
5692	20337.11	5907.13	0.2269	79.09	3	3	1	1	0

Kontrollserie 06

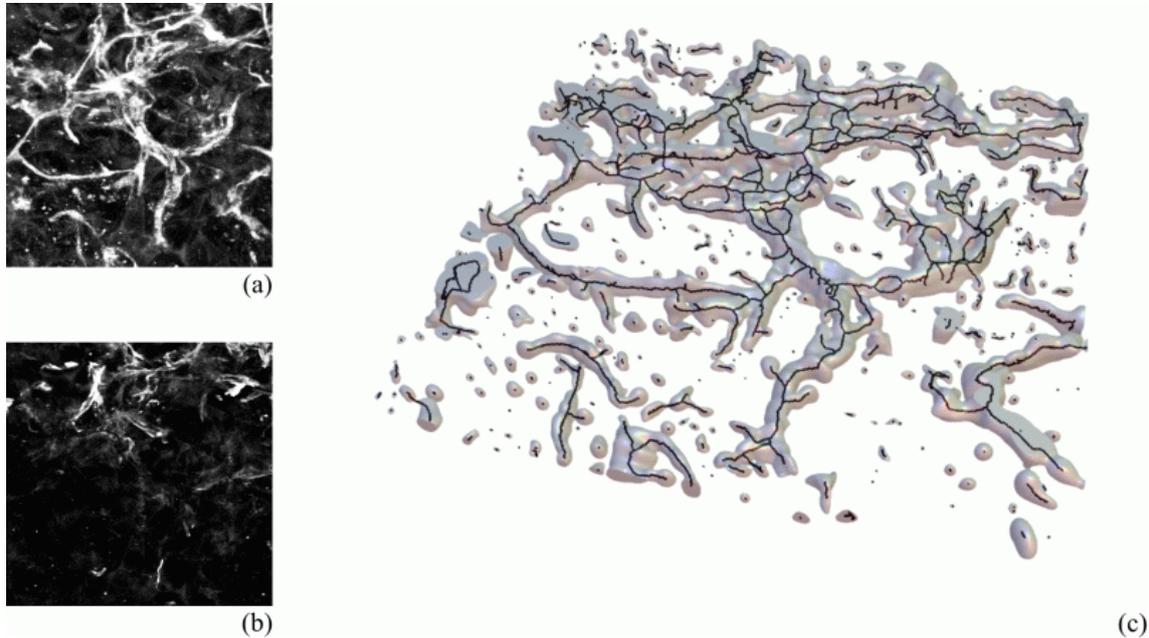


Abbildung B.11.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	4.5
Objektkomponenten	302	Bedeckungsgrad	10.04%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	1	Linienzüge im Skelett	936
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	16.82%	Endpunkte im Skelett	815
Gesamtoberfläche der Komponenten	1084340.59 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	350
Gesamtvolumen der Komponenten	6609678.18 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	345/5/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.0718	Gesamtlänge des Skelettes	15832.03 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
1381863	5170725.08	731505.85	0.0077	11877.99	555	199	302	297	5
91779	342856.66	51756.16	0.0959	577.20	25	11	13	13	0
35524	130614.58	23486.91	0.1489	362.06	11	4	6	6	0
29734	110314.00	18763.63	0.2083	224.10	3	3	1	1	0
23998	89763.37	17904.80	0.1588	250.18	12	6	6	6	0
16890	63211.17	13304.88	0.1919	199.67	9	6	4	4	0
13475	50422.46	11977.89	0.1673	200.28	5	4	2	2	0
12412	45846.21	10486.44	0.2061	136.26	11	7	5	5	0
8019	30165.20	6125.10	0.4478	41.95	1	2	0	0	0
7832	29667.17	7483.96	0.2375	113.88	3	3	1	1	0

Perfusionsserie 01

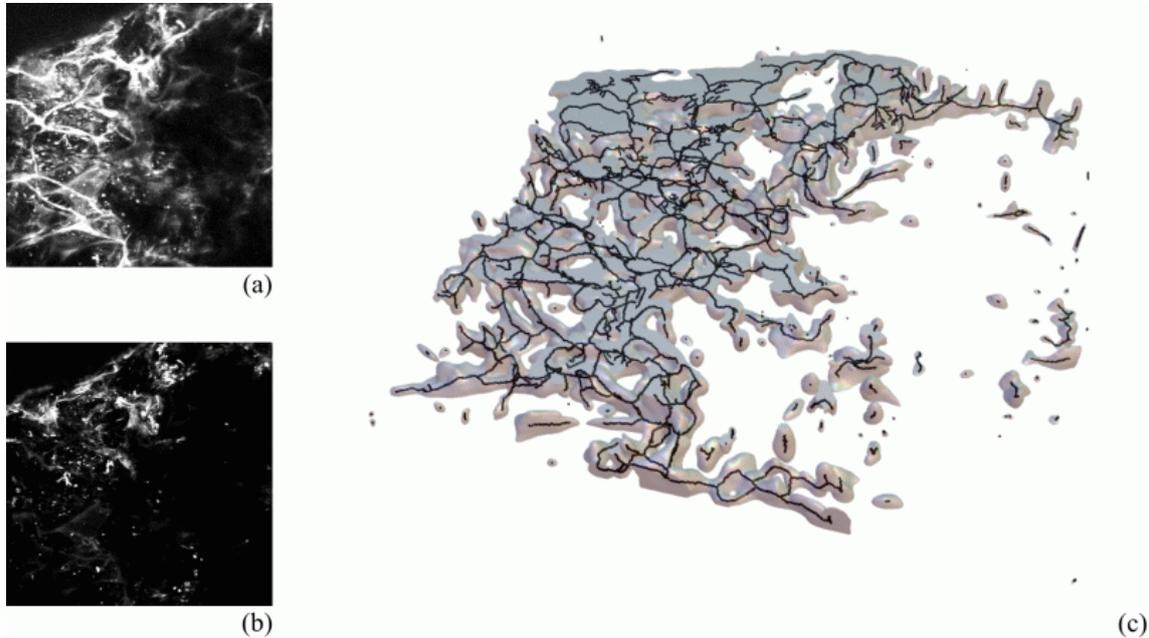


Abbildung B.12.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	4.7
Objektcomponenten	118	Bedeckungsgrad	7.53%
Hintergrundcomponenten vor dem Füllen	3	Linienzüge im Skelett	1313
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	20.27%	Endpunkte im Skelett	669
Gesamtoberfläche der Componenten	1172895.57 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	644
Gesamtvolumen der Componenten	7966085.1 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	619/25/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Componenten	0.0252	Gesamtlänge des Skelettes	22186.83 μm

Daten der zehn größten Componenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
2035104	7521775.84	1032541.94	0.0058	20440.85	1175	429	632	607	25
20219	73772.65	16197.50	0.1448	215.41	9	6	4	4	0
14183	50423.29	12014.16	0.1658	162.45	1	2	0	0	0
8732	31852.64	6740.01	0.3748	54.23	1	2	0	0	0
5372	19387.69	4727.19	0.4024	42.38	1	2	0	0	0
5329	18846.11	4994.88	0.3223	50.73	1	2	0	0	0
4955	18040.01	4005.52	0.5727	47.30	5	4	2	2	0
4802	17686.91	4325.13	0.4373	36.33	1	2	0	0	0
4452	15217.78	5850.77	0.1308	127.64	7	5	3	3	0
3901	14540.67	3643.35	0.4944	35.14	1	2	0	0	0

Perfusionsserie 02

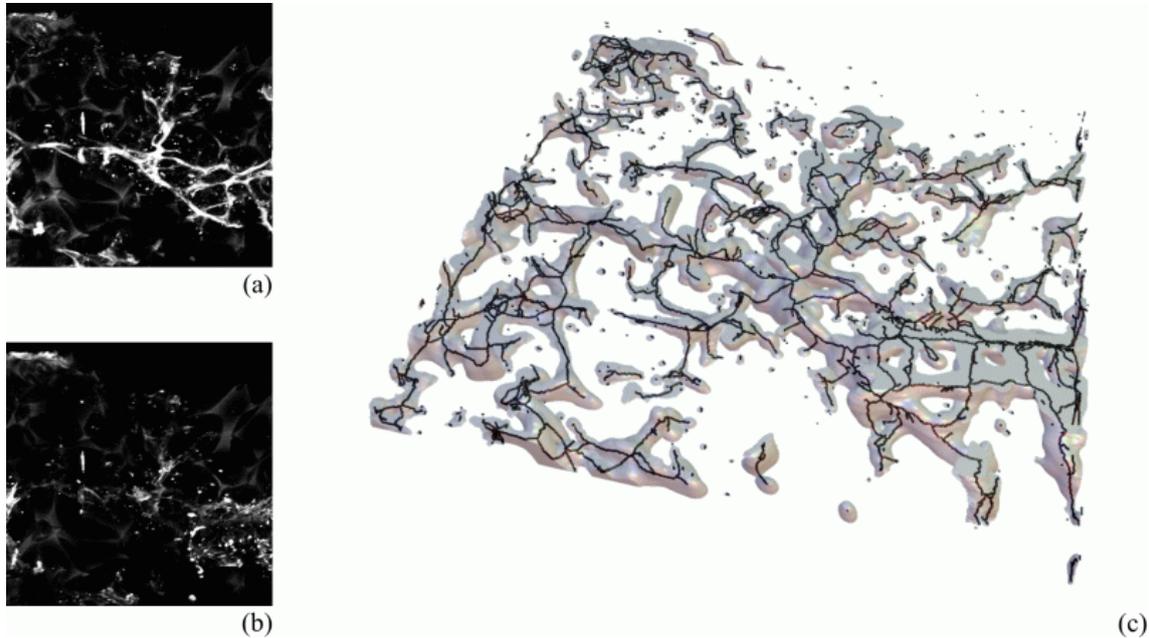


Abbildung B.13.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	0.8
Objektcomponenten	491	Bedeckungsgrad	42.39%
Hintergrundcomponenten vor dem Füllen	7	Linienzüge im Skelett	1681
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	14.74%	Endpunkte im Skelett	1319
Gesamtoberfläche der Componenten	1167510.02 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	673
Gesamtvolumen der Componenten	5792486.81 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	657/16/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Componenten	0.0318	Gesamtlänge des Skelettes	23825.48 μm

Daten der zehn größten Componenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
1191649	4312737.17	716845.80	0.0057	14436.41	800	262	442	434	8
129656	462748.07	81331.58	0.0450	1758.49	108	27	62	59	3
57955	190018.52	68016.54	0.0130	1587.41	89	27	49	47	2
51441	178952.12	44543.06	0.0410	910.90	47	16	26	26	0
30844	103139.56	33160.36	0.0330	886.85	47	12	26	24	2
21605	73303.61	22634.56	0.0524	549.97	34	13	18	17	1
13448	45457.13	12071.90	0.1328	190.43	13	8	6	6	0
12371	37521.70	17254.44	0.0310	370.53	19	8	10	10	0
9564	35527.72	7067.80	0.4043	99.18	1	2	0	0	0
9968	35163.91	8163.62	0.2570	135.09	5	4	2	2	0

Perfusionsserie 03

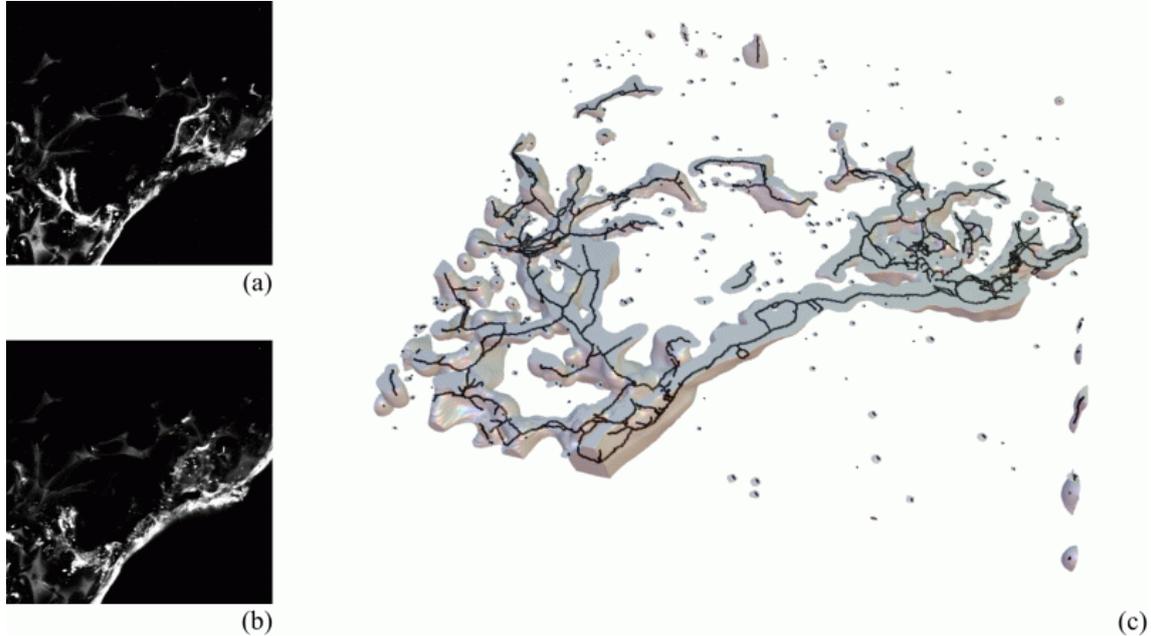


Abbildung B.14.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	0.6
Objektcomponenten	269	Bedeckungsgrad	72.64%
Hintergrundcomponenten vor dem Füllen	1	Linienzüge im Skelett	822
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	9.8%	Endpunkte im Skelett	698
Gesamtoberfläche der Componenten	668636.76 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	311
Gesamtvolumen der Componenten	3850861.04 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	305/5/1
Ø gewichtete Kompaktheit der Componenten	0.0276	Gesamtlänge des Skelettes	11106.88 μm

Daten der zehn größten Componenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er	5er
961018	3515000.20	544865.11	0.0086	9258.70	534	184	291	285	5	1
35355	129094.22	24761.92	0.1241	392.23	9	4	4	4	0	0
11579	40499.39	13426.35	0.0766	289.80	24	9	13	13	0	0
7888	26751.07	9743.73	0.0875	185.68	5	4	2	2	0	0
5247	19344.56	4436.69	0.4846	39.56	1	2	0	0	0	0
3921	13370.66	4680.45	0.1972	50.74	1	2	0	0	0	0
3701	12629.45	3803.19	0.3279	8.43	1	2	0	0	0	0
2604	8716.59	3007.61	0.3159	1.56	1	2	0	0	0	0
2287	8401.26	2212.08	0.7375	1.56	1	2	0	0	0	0
2538	8378.89	3719.82	0.1543	55.54	1	2	0	0	0	0

Perfusionsserie 04

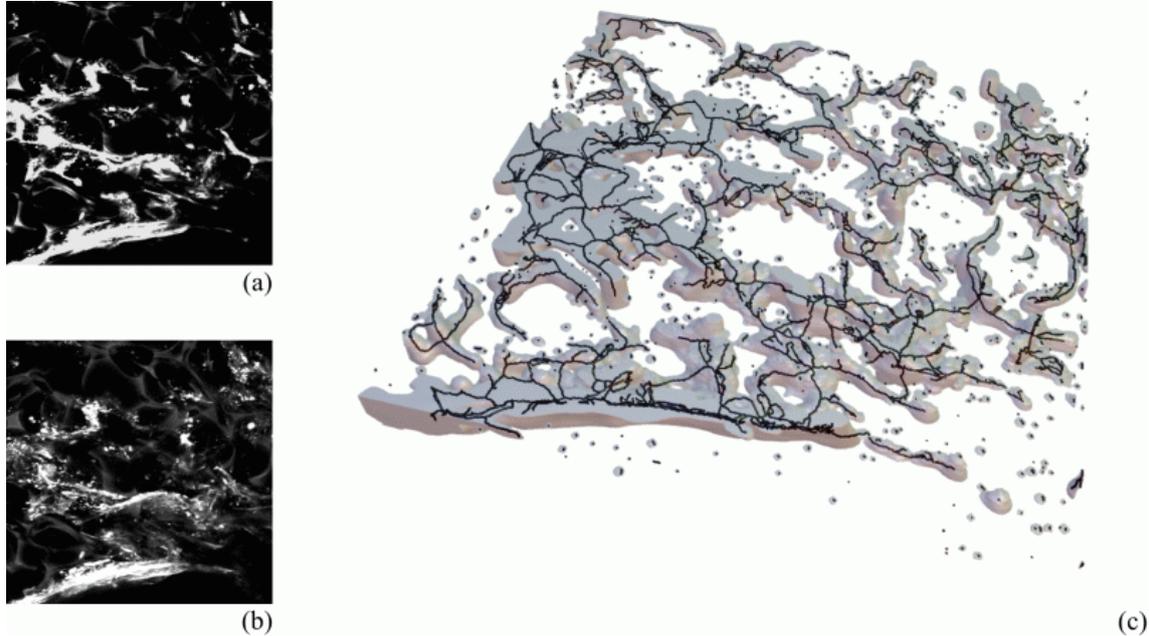


Abbildung B.15.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	0.1
Objektcomponenten	719	Bedeckungsgrad	78.76%
Hintergrundcomponenten vor dem Füllen	8	Linienzüge im Skelett	2088
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	21.03%	Endpunkte im Skelett	1794
Gesamtoberfläche der Componenten	1463060.75 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	784
Gesamtvolumen der Componenten	8264733.79 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	758/26/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Componenten	0.0226	Gesamtlänge des Skelettes	26168.15 μm

Daten der zehn größten Componenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
1945966	7340289.57	1116615.47	0.0044	20282.47	1211	385	669	643	26
41456	163178.29	40790.39	0.0444	888.14	51	15	29	29	0
31455	119417.89	24757.11	0.1063	403.21	15	6	8	8	0
26519	105892.82	28641.59	0.0540	648.20	45	12	26	26	0
25222	99072.08	28945.81	0.0458	484.54	30	12	16	16	0
17910	68312.56	10708.04	0.4299	50.31	3	3	1	1	0
16480	59204.53	18203.95	0.0657	351.71	9	6	4	4	0
14452	55093.13	9870.10	0.3570	86.95	3	3	1	1	0
6691	26002.09	6222.69	0.3173	67.74	1	2	0	0	0
5871	22775.57	8390.50	0.0993	169.66	7	5	3	3	0

Perfusionsserie 05

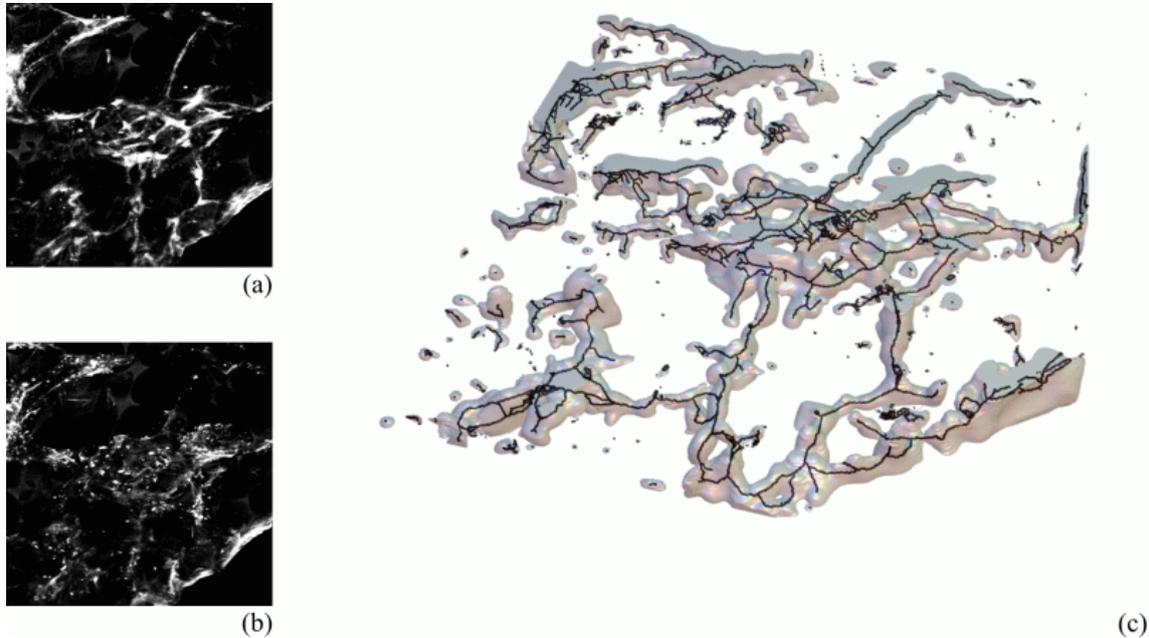


Abbildung B.16.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebenvolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	1.0
Objektcomponenten	273	Bedeckungsgrad	53.04%
Hintergrundcomponenten vor dem Füllen	55	Linienzüge im Skelett	1582
von Endothelzellen belegtes Gewebenvolumen	13.48%	Endpunkte im Skelett	636
Gesamtoberfläche der Componenten	918558.37 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	785
Gesamtvolumen der Componenten	5298849.94 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	698/75/12
Ø gewichtete Kompaktheit der Componenten	0.0322	Gesamtlänge des Skelettes	17591.19 μm

Daten der zehn größten Componenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er	5er
1026833	3783698.90	603618.57	0.0074	10820.76	738	164	414	377	28	9
283022	1040664.49	148425.12	0.0375	2605.69	154	54	81	74	7	0
22251	83132.79	16583.40	0.1714	425.29	52	7	32	31	1	0
19194	69245.57	19069.40	0.0782	383.62	33	5	20	19	1	0
11289	42232.16	8698.61	0.3065	45.50	1	2	0	0	0	0
10477	37374.91	10570.28	0.1338	225.08	13	6	6	6	0	0
9939	35115.42	9816.20	0.1474	193.44	13	3	7	7	0	0
7045	25958.50	6393.41	0.2916	52.17	1	2	0	0	0	0
6298	21951.28	10264.68	0.0504	535.06	95	10	56	50	6	0
4563	16409.12	4902.00	0.2585	114.14	15	2	8	6	2	0

Perfusionsserie 06

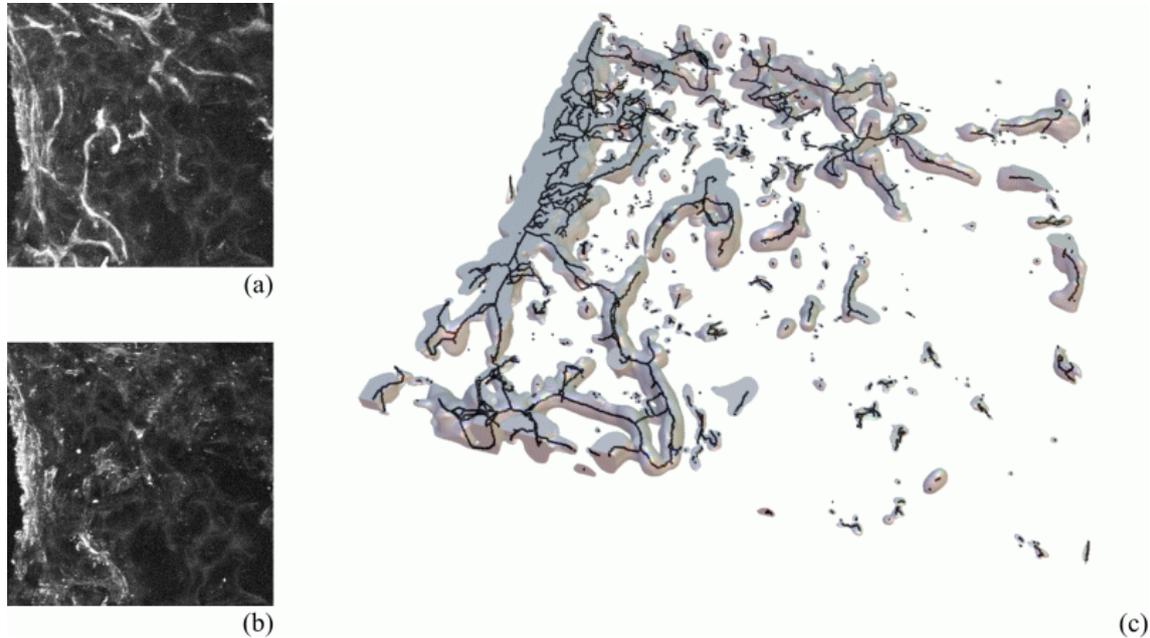


Abbildung B.17.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	4.5
Objektkomponenten	431	Bedeckungsgrad	21.6%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	3	Linienzüge im Skelett	1141
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	12.16%	Endpunkte im Skelett	1070
Gesamtoberfläche der Komponenten	839590.24 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	397
Gesamtvolumen der Komponenten	4777258.8 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	383/13/1
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.068	Gesamtlänge des Skelettes	15108.09 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er	5er
801172	2955226.36	423562.57	0.0130	8215.14	481	163	262	254	7	1
207634	761148.70	131555.98	0.0288	2067.18	88	33	47	45	2	0
89581	332470.55	46246.86	0.1264	604.74	35	14	18	16	2	0
26438	97824.26	16536.92	0.2393	224.21	15	6	8	8	0	0
25027	93960.07	14434.44	0.3320	158.85	5	4	2	2	0	0
18334	68091.97	13619.48	0.2076	191.35	5	4	2	2	0	0
18064	65921.44	12190.81	0.2713	91.76	5	4	2	2	0	0
10069	37071.43	7173.17	0.4211	40.88	1	2	0	0	0	0
9875	36189.48	8710.54	0.2241	142.94	3	3	1	1	0	0
6138	21603.56	5621.50	0.2971	91.73	3	3	1	1	0	0

Perfusionsserie 07

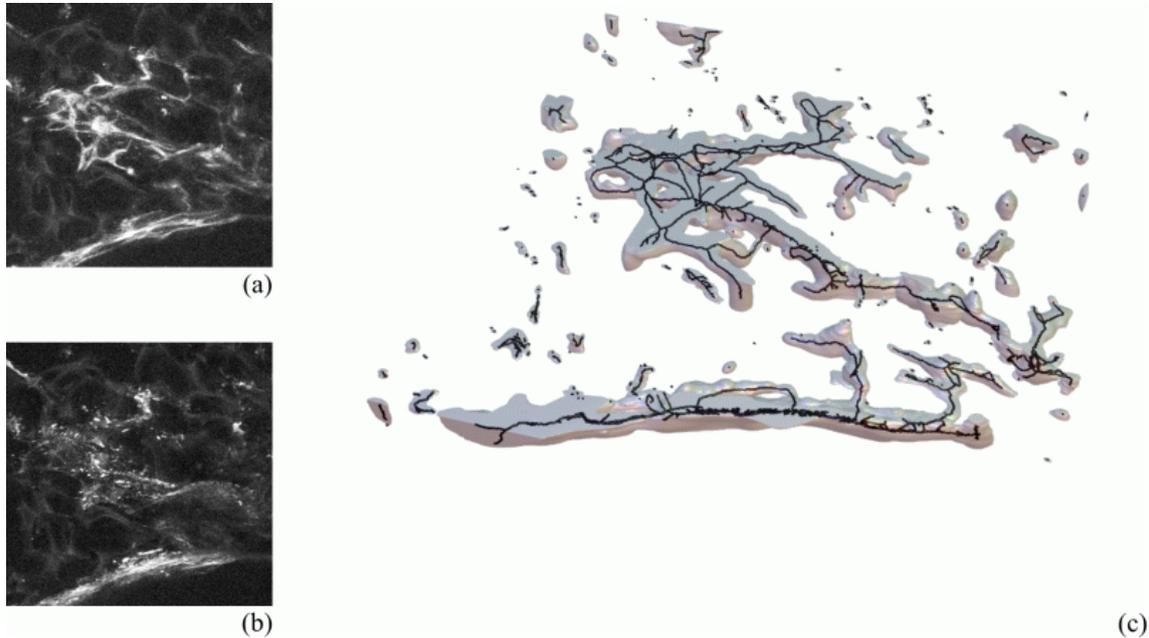


Abbildung B.18.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	4.1
Objektcomponenten	181	Bedeckungsgrad	30.52%
Hintergrundcomponenten vor dem Füllen	2	Linienzüge im Skelett	728
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	9.42%	Endpunkte im Skelett	562
Gesamtoberfläche der Componenten	601083.08 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	294
Gesamtvolumen der Componenten	3700947.80 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	285/8/1
Ø gewichtete Kompaktheit der Componenten	0.0608	Gesamtlänge des Skelettes	10553.82 μm

Daten der zehn größten Componenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er	5er
572783	2107362.38	285391.85	0.0216	4733.46	212	71	116	111	5	1
309877	1134218.35	161453.66	0.0346	3367.34	239	109	122	121	1	0
24848	90436.86	26916.95	0.0474	615.08	36	12	20	20	0	0
14886	54236.14	9608.37	0.3750	68.85	5	4	2	2	0	0
10217	37428.47	8018.54	0.3073	68.02	1	2	0	0	0	0
9661	35430.87	8550.31	0.2271	114.05	5	4	2	2	0	0
8666	31662.12	7215.75	0.3018	103.36	8	4	4	4	0	0
8712	29821.49	11727.57	0.0624	180.67	7	5	3	3	0	0
6907	25730.50	4643.58	0.7478	1.54	1	2	0	0	0	0
4212	15834.83	3174.04	0.8868	2.19	1	2	0	0	0	0

Perfusionsserie 08

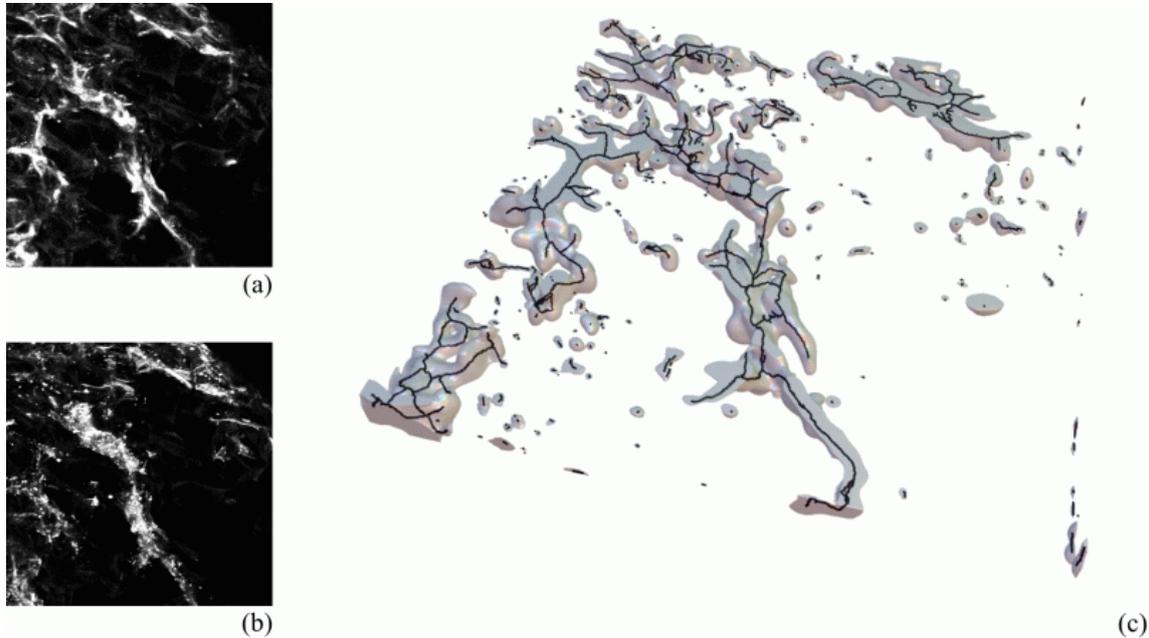


Abbildung B.19.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebevolument	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	2.2
Objektkomponenten	264	Bedeckungsgrad	48.74%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	1	Linienzüge im Skelett	631
von Endothelzellen belegtes Gewebevolument	9.64%	Endpunkte im Skelett	643
Gesamtoberfläche der Komponenten	654330.31 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	206
Gesamtvolumen der Komponenten	3787158.37 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	205/1/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.0845	Gesamtlänge des Skelettes	9629.43 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
401364	1489370.49	200388.34	0.0312	3020.41	135	59	70	69	1
156022	579520.89	87005.20	0.0577	1276.32	57	21	31	31	0
141147	519206.03	83363.37	0.0526	1227.60	52	20	28	28	0
113361	417984.92	77254.76	0.0429	1199.35	63	27	33	33	0
105296	382854.33	59400.33	0.0791	824.35	36	15	19	19	0
10336	39520.37	10005.33	0.1764	211.85	18	6	10	10	0
8471	32022.90	9134.16	0.1522	201.74	9	6	4	4	0
7324	26859.24	7419.29	0.1998	153.04	7	5	3	3	0
5461	20766.37	5444.93	0.3021	111.54	8	1	5	5	0
5400	20122.26	5101.58	0.3449	48.30	1	2	0	0	0

Perfusionsserie 09

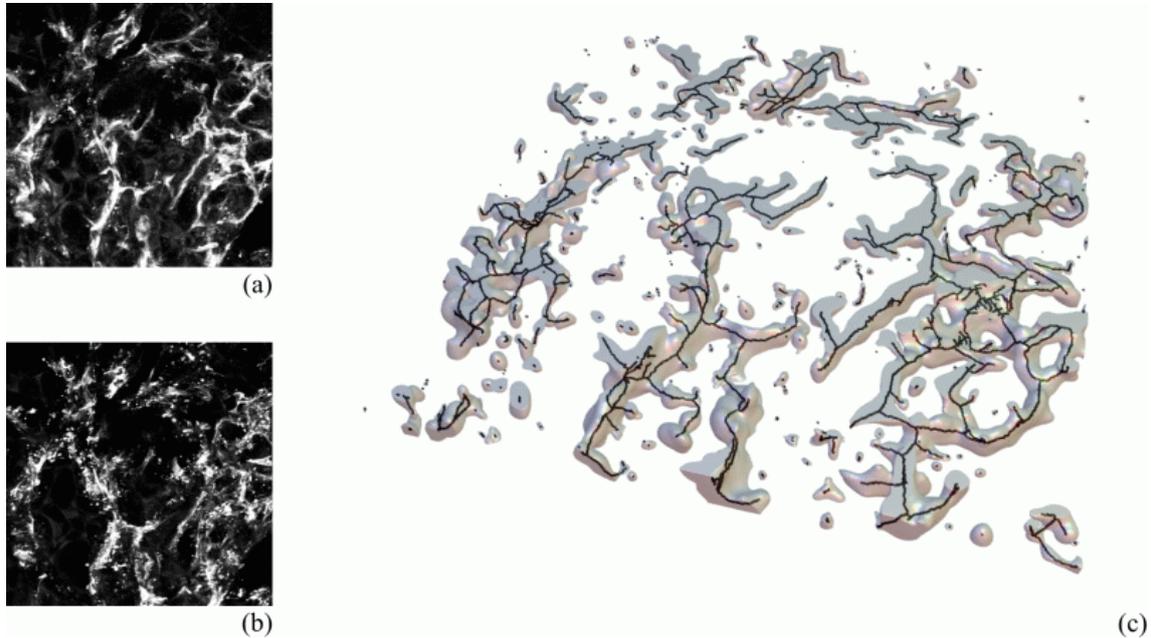


Abbildung B.20.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebenvolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	3.1
Objektkomponenten	227	Bedeckungsgrad	47.63%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	2	Linienzüge im Skelett	753
von Endothelzellen belegtes Gewebenvolumen	12.62%	Endpunkte im Skelett	633
Gesamtoberfläche der Komponenten	878566.64 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	290
Gesamtvolumen der Komponenten	4959003.15 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	287/3/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.0615	Gesamtlänge des Skelettes	13408.39 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
527423	1962063.25	298302.50	0.0164	4799.73	239	100	125	122	3
302063	1113913.24	178130.69	0.0248	2686.66	119	49	63	63	0
240852	890926.04	134292.88	0.0371	2195.09	104	37	57	57	0
68666	252995.84	43919.11	0.0855	651.62	22	8	12	12	0
52879	190872.63	47426.42	0.0386	824.24	21	9	11	11	0
28141	100580.19	25725.29	0.0672	458.61	19	11	9	9	0
14657	53801.50	10896.88	0.2530	198.79	8	4	4	4	0
14314	51997.40	10745.84	0.2464	133.02	3	3	1	1	0
12495	45269.23	9178.38	0.2998	61.09	1	2	0	0	0
6092	22077.22	5530.51	0.3259	75.14	3	3	1	1	0

Perfusionsserie 10

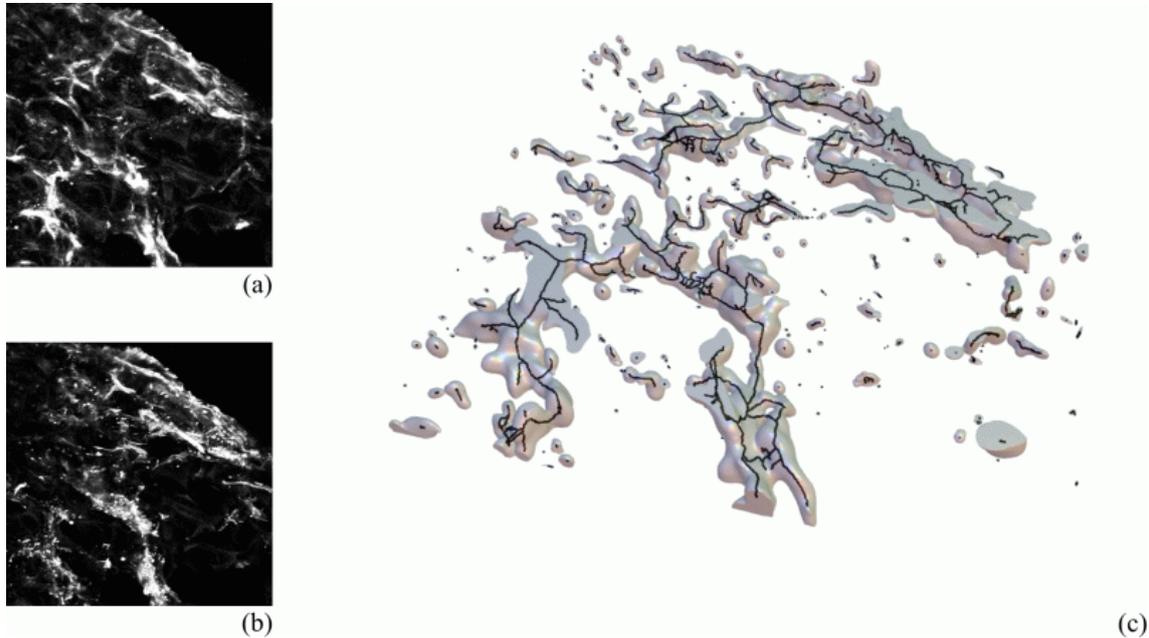


Abbildung B.21.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	3.0
Objektkomponenten	229	Bedeckungsgrad	45.4%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	1	Linienzüge im Skelett	665
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	10.42%	Endpunkte im Skelett	620
Gesamtoberfläche der Komponenten	703249.01 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	235
Gesamtvolumen der Komponenten	4092976.08 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	232/3/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.0842	Gesamtlänge des Skelettes	9974.85 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
474990	1750921.22	263761.54	0.0189	4017.92	214	84	114	112	2
264900	980011.03	143935.39	0.0364	2210.96	113	48	59	58	1
196864	729903.29	100384.88	0.0596	1292.70	54	24	28	28	0
18528	68024.91	13261.78	0.2244	147.39	7	5	3	3	0
15018	54622.96	11345.66	0.2311	117.83	8	4	4	4	0
11416	41131.07	12547.99	0.0968	297.47	12	6	6	6	0
9798	36263.72	6445.06	0.5555	7.89	1	2	0	0	0
9518	34517.18	8398.42	0.2275	127.29	7	5	3	3	0
7290	27178.41	7031.21	0.2403	125.48	8	4	4	4	0
5718	21123.44	5801.94	0.2584	66.81	5	4	2	2	0

Perfusionsserie 11

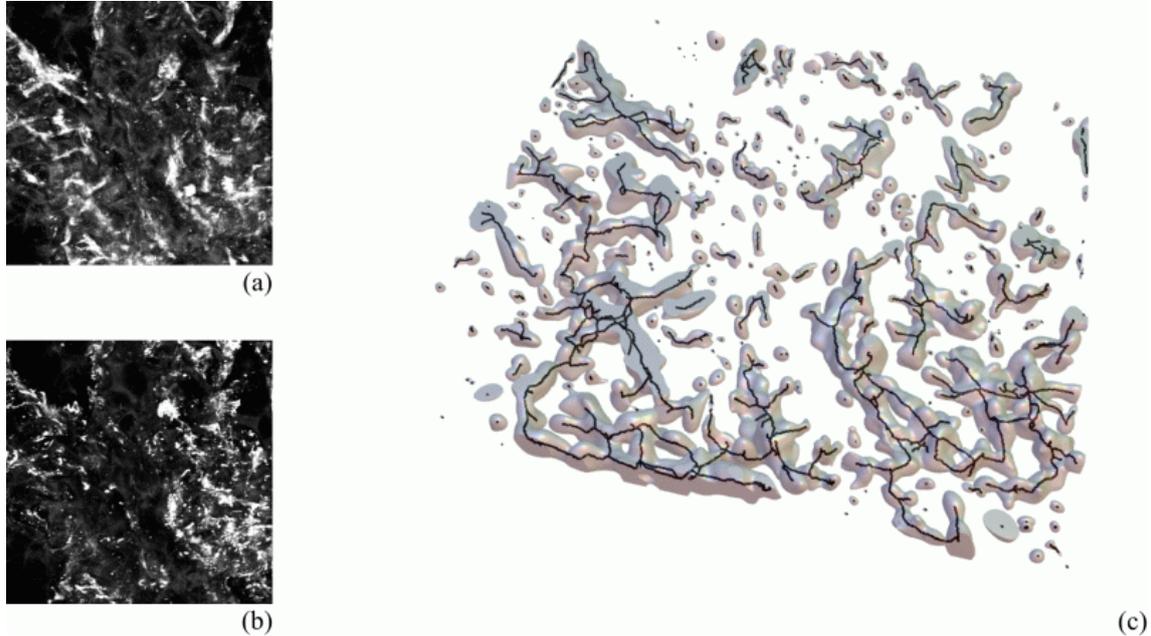


Abbildung B.22.: Maximumprojektionen von Endothel- (a) und Muskeldatensatz (b) sowie Oberfläche und Skelett des Endotheldatensatzes (c)

Reifungsparameter des analysierten Endotheldatensatzes:

betrachtetes Gewebevolumen	0.03929794413 mm ³	angewandter Schwellwert	5.0
Objektkomponenten	239	Bedeckungsgrad	35.25%
Hintergrundkomponenten vor dem Füllen	1	Linienzüge im Skelett	697
von Endothelzellen belegtes Gewebevolumen	13.84%	Endpunkte im Skelett	649
Gesamtoberfläche der Komponenten	975415.1 μm ²	Kreuzungspunkte im Skelett	246
Gesamtvolumen der Komponenten	5438165.28 μm ³	3er/4er/5er Kreuzungen	239/7/0
Ø gewichtete Kompaktheit der Komponenten	0.1238	Gesamtlänge des Skelettes	12148.78 μm

Daten der zehn größten Komponenten des Endotheldatensatzes:

Voxelanzahl	Volumen in μm ³	Fläche in μm ²	Kompaktheit	Gesamtlänge in μm	Linien	Endpunkte	Kreuzungen	3er	4er
459217	1706876.71	268701.01	0.0170	3816.55	162	63	86	83	3
330648	1227742.29	181532.06	0.0285	2436.05	123	51	64	61	3
143820	538417.32	72338.24	0.0866	958.15	35	15	18	17	1
85811	319091.78	54949.67	0.0694	740.40	24	12	12	12	0
52436	196418.06	29161.51	0.1759	426.40	19	8	10	10	0
44348	165770.48	28985.26	0.1276	359.02	21	12	10	10	0
31840	119078.39	19569.86	0.2140	187.78	9	6	4	4	0
24657	91585.23	17589.51	0.1743	249.97	10	5	5	5	0
22724	84261.28	13416.99	0.3325	154.02	11	7	5	5	0
22200	82808.13	16209.97	0.1821	194.64	7	5	3	3	0