Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstände: Univ. Prof. Dr. med. G. ten Bruggencate Univ. Prof. Dr. med. E. Gerlach Univ. Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. K. Thurau

Quantitative Analyse der Öffnung der Blut-Hirnschranke mit intravitaler Fluoreszenzmikroskopie und digitaler Bildverarbeitung

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von Dipl.-Ing. Univ. Axel Findling

aus

München

Jahr

1997

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1. Einleitung	5
2. Methodik	14
2.1. Operative Eingriffe	14
2.2. Verwendete Lösungen	15
2.3. Tracerinfusion und corticale Superfusion	16
2.4. Technischer Versuchsablauf und Bildgewinnung	16
2.5. Gefäßdurchmessermessung	19
2.6. Messung der Plasmaintensität	20
2.7. Statistik	22
3. Systembeschreibung	24
3.1. Hardware	24
3.2. Software	26
3.3. Bildformat	27
4 Voruntersuchungen	28
4 1. Allgemeines	28
4.2. Stabilität des Anregungslichtes	28
4.3. Background-Intensität	30
4.4. Fading	30
4.4.1. Durchlaufbeleuchtung	30
4.4.2. Dauerbeleuchtung	31
5. Digitalisierung	33
5.1. Allgemeines	33
5.2. Rauschminderung durch Mittelung	33
5.3. Automatisches Digitalisierungsverfahren	35
6. Shadingkorrekturverfahren	40
6.1. Allgemeines	40
6.2. Shadingkorrekturverfahren in vitro	41
6.2.1. Unverändertes 'in vitro'-Bild	41
6.2.2. Angepaßtes 'in vitro'-Bild	42
6.3. Synthetische Shadingkorrekturverfahren	46
6.3.1. Zweidimensionale Funktion	46
6.3.2. Spezielle Tiefpaßfilterung	50
6.4. Gütevergleich der Shadingkorrekturverfahren	53
6.4.1. Optimieren der Shadingkorrekturverfahren	55

6.4.1.1. Angepaßtes 'in vitro'-Bild	57
6.4.1.2. Zweidimensionale Funktion	60
6.4.1.3. Spezielle Tiefpaßfilterung	65
6.4.2. Vergleich der Shadingkorrekturverfahren	67
6.5. Möglichkeiten der Anwendung	69
7. Helligkeitsangleich	71
7.1. Allgemeines	71
7.2. Helligkeitsangleich vor der Subtraktion	71
7.2.1. Additiver Helligkeitsangleich	71
7.2.2. Multiplikativer Helligkeitsangleich	72
8. Lagekorrektur	74
8.1. Allgemeines	74
8.2. Manuelle Lagekorrektur	74
8.2.1. Ermittlung der Verschiebung	75
8.2.2. Verschieben des zu untersuchenden Bildes	75
8.3. Automatische Lagekorrektur	76
9 Subtraktion und Bauschminderung	79
9.1 Subtraktion	
9.2 Bauschminderung durch Medianfilterung	
10. Subtraktionsbildnachbearbeitung	81
10.1. Allgemeines	81
10.2. Helligkeitsangleich nach der Subtraktion	81
10.2.1. Helligkeitsangleich über den Maximalwert	82
10.2.2. Helligkeitsangleich über den Medianwert	82
10.2.3. Helligkeitsangleich über den Mittelwert	83
10.2.4. Möglichkeiten der Bildbearbeitung	83
10.2.4.1. Hochpaß	83
10.2.4.2. Bandsperre	83
10.3. Strukturelimination	83
10.3.1. Datenermittlung	84
10.3.2. Bildbearbeitung	84
10.3.3. Probleme	84
10.4. Getaßbaumelimination	85
10.4.1. Methode	85
10.4.2. Probleme	86
10.5. Methode der Mustererkennung	87
10.6. Flächenelimination	87

11. Extravasationswertbestimmung	88
12. Gütevergleich	89
12.1. Allgemeines	89
12.2. Berechnung der Fehlgüte	89
12.3. Rangkorrelation nach Spearman	92
12.4. Verwendete Bilder	94
12.5. Ermittlung eines verbesserten Verfahrens	96
12.5.1. Shadingkorrektur	96
12.5.2. Helligkeitsangleich vor der Subtraktion	99
12.5.3. Helligkeitsangleich nach der Subtraktion	101
12.5.4. Strukturelimination	108
12.5.5. Flächenelimination	111
12.5.6. Lagekorrektur	113
12.5.7. Zusammenfassung	116
13. Verifikation der Methode	133
13.1. Allgemeines	133
13.2. Kontrollversuche	133
13.3. Hyperkapnie induzierte Dilatation	137
13.4. Nikotin induzierte Extravasation	140
13.5.Adenosin induzierte Extravasation und Dilatation	145
13.6.Zusammenfassung der tierexperimentell gewonnenen Ergebnisse	149
14. Zusammenfassung	151
15. Literaturverzeichnis	154
Anhang	164
Digitale Filterfunktionen	164
A1. Medianfilterung	164
A2. Tiefpaßfilterung	165

1. Einleitung

Das Gehirn benötigt für seine Funktionsfähigkeit ein konstantes Milieu interieur (Homöostase). Bereits geringe Konzentrationsänderungen von Ionen und Neurotransmittern in der Extrazellulärflüssigkeit können die Erregbarkeit der Neurone und damit die Funktionsfähigkeit des Gehirns stark beeinflussen. Deshalb ist es notwendig, daß Konzentrationsunterschiede für Ionen, Hormone und Aminosäuren, die als Neurotransmitter oder Vorläufer für Neurotransmitter wirken, zwischen dem Blutplasma und dem Extrazellulärraum des Gehirns über die Wände der cerebralen Blutgefäße aufgebaut und aufrecht erhalten werden. Die Gefäßwand bildet somit eine Barriere zwischen Plasmaraum einerseits und dem Extrazellulärraum des Gehirns andererseits. Diese als Blut-Hirnschranke (BHS) bezeichnete Barriere hat ihr morphologisches Korrelat in dem kontinuierlichen Endothel der Blutgefäße (Reese und Karnovsky [69]). Mit Ausnahme der zirkumventrikulären Organe, in denen die Blut-Hirnschranke nicht ausgebildet ist (Gross [41]), lassen sich unter dem Elektronenmikroskop folgende Kennzeichen der Endothelzellen cerebraler Gefäße beobachten (Bradbury [10,11], Cornford [20], Crone [25], Davson [28], Pardridge [65], Risau und Wolburg [71]) (siehe Abbildung 1.1.):

- hohe Anzahl an Mitochondrien
- geringe Zahl pinocytotischer Vesikel
- komplexe feste Zwischenzellkontakte ('tight junctions')
- enzymatische Aktivität

Diese Characteristica gelten nach Abbott und Revest [1] sowohl für intra- als auch extraparenchymale Gefäße.

Pinocytotische Vesikel, die einen relativ unselektiven Transport durch die Kapillarwand ermöglichen würden, sind in cerebralen Endothelzellen nur in äußerst geringer Anzahl vorhanden. Die festen Zellkontakte (tight junctions) bewirken einen scheinbaren Verschluß parazellulärer Wege und somit eine minimale Diffusion (restricted diffusion) wasserlöslicher Substanzen. Die Schrankenfunktion wurde erstmals von Paul Ehrlich [31] beschrieben, der nach intravenöser Injektion von Farbstoffen die Anfärbung aller Organe mit Ausnahme des Gehirns beobachtete. Später wurde die Bedeutung der interendothelialen 'tight junctions' für die Barrierenfunktion von Brightman und Reese [13] und Reese und Karnovsky [69] mit den Markern Meerettichperoxidase und Mikroperoxidase deutlich gemacht. Diese Autoren konnten elektronenmikroskopisch nachweisen, daß diese Marker weder vom Blut noch vom interstitiellen Raum des Gehirns aus die 'tight junctions' penetrieren

konnten. Dabei wurde auch festgestellt, daß die Astrozyten, deren Füßchen die Hirnkapillaren fast vollständig umschließen (siehe Abbildung 1.2.), selbst keine Barriere darstellen, allerdings für die Induktion der BHS notwendig sind (Risau und Wolburg [71]).



Abbildung 1.1.: Querschnitt durch eine cerebrale Kapillare nach Goldstein und Betz [39]



Abbildung 1.2.: 3-D-Darstellung einer cerebralen Kapillare nach Goldstein und Betz [39]

Während fettlösliche Substanzen wie Ethanol, Nikotin und Coffein durch einfache Diffusion die BHS überwinden können (Oldendorf [61], Russel et al. [75]), werden im Gegensatz dazu wasserlösliche Substanzen (z. B. Glucose oder bestimmte essentielle Aminosäuren (Roettger und Goldfinger [73])) von der Lipidphase der Endothelmembran abgestoßen. Somit verhält sich das kontinuierliche Endothel mit tight junctions wie ein dichtes Epithel. Funktionelle Kennzeichen eines dichten Epithels und der BHS sind (Abbott und Revest [1], Butt et al. [16], Crone [23-25], Crone und Olesen [22]):

- ein hoher transendothelialer elektrischer Widerstand
- eine geringe Diffusionspermeabilität für hydrophile Substanzen
- eine geringe hydraulische Leitfähigkeit
- ein hoher Reflexionskoeffizient für hydrohile Substanzen

Viele wasserlösliche Substanzen (z.B.: Glucose und Aminosäuren) werden jedoch vom Gehirn benötigt und müssen daher über spezielle Transportmechanismen wie erleichterte Diffusion oder durch primär oder sekundär aktive Transportsysteme die BHS überwinden. Erleichterte Diffusion beruht auf der Anwesenheit von substanzbzw. substanzgruppen- und stereospezifischen Carriern an der luminalen und der abluminalen Endothelmembran. Über diese Carrier können Glucose (Crone [21],

Oldendorf [60], Rapoport [68]), neutrale sowie basische Aminosäuren (Cornford [20], Oldendorf und Szabo [62]), Monocarbonsäuren und Purine (Cornford [20]) entlang ihres jeweiligen chemischen Gradienten die BHS permeieren (siehe Abbildung 1.3.).



Abbildung 1.3.: Schematische Darstellung der BHS-Funktion cerebraler Endothelien

Neben der erleichterten Diffusion sind an den Endothelzellen der Hirngefäße auch primär aktive Transporte nachgewiesen worden. So stellt der Kalium-Transport aus dem Gehirn einen primär aktiven Transport an der abluminalen Membran dar (siehe Abbildung 1.3.). Dieser wird nach Betz et. al. [7] von einer Natrium-Kalium-ATPase durchgeführt, die Kalium aus dem Gehirn in die Endothelzelle und gleichzeitig Natrium in Gegenrichtung transportiert. Die Energie, die dabei verbraucht wird, wird durch ATP-Spaltung bereitgestellt. Die Kaliumionen haben einen starken Einfluß auf das Membranpotential und damit die Erregbarkeit der Neurone. Daher muß die Kaliumkonzentration im Extrazellulärraum des Gehirns möglichst konstant gehalten werden. Daneben werden noch andere primär aktive Transportsysteme, bei denen sich die Carrier in der abluminalen Membran der Endothelzellen befinden, diskutiert. Diese Transporte verhindern es, daß erregende Transmitter wie Glutamat oder hemmende Transmitter wie Gamma-Aminobuttersäure und Glycin aus dem Gehirn in die Endothelzellen gelangen können und so das Gehirn verlassen können (Cornford [20]). Auch an der luminalen Endothelmembran ist ein aktive Transport

nachgewiesen, der lipophile Medikamente, die durch Diffusion in die Endothelzellen gelangt sind, wieder aus der Endothelzelle ins Blut transportiert (Cordon-Cardo et al. [19], Risau und Wolburg [71]). Dieser 'multidrug resistance transporter' ist ein P-Glycoprotein mit ATPase-Aktivität (Ruetz und Gros [74]). Zudem existieren in der luminalen Membran der Endothelzelle mehrere sekundär aktive Transportmechanismen, z. B. der Natrium-Protonen-Antiporter, der Chlorid-Bicarbonat-Antiporter und der Natrium-Kalium-Symport (Betz und Goldstein [8], Goldstein und Betz [39], Vigne et al. [94]) (siehe Abbildung 1.3.). Schließlich stellt die BHS mit zahlreichen intrazellulären und membrangebundenen Ektoenzymen eine metabolische Barriere dar. So weiß man schon lange, daß die Aminosäure L-Dopa über den Carrier für große neutrale Aminosäuren zwar in das Endothel und zum Teil in das Gehirn eindringen kann, daß aber ein Teil des Dopa durch Enzyme abgebaut wird und somit nicht mehr ungehindert das Endothel verlassen kann (Bertler et al. [6], Goldstein und Betz [39]) (siehe Abbildung 1.3.). Ein weiteres Beispiel ist die γ -Glutamyltranspeptidase, die vorwiegend von Pericyten gebildet wird und durch Abbau der Leukotriene deren Passage über die BHS verhindert (Black et al. [9], Risau et al. [72]). Alle diese Mechanismen ermöglichen einen sehr kontrollierten und selektiven Austausch zwischen Blut und Gehirn und sichern eine optimale Homöostase des Gehirns unter physiologischen Bedingungen.

Unter verschiedenen pathologischen Bedingungen wie Trauma, Ischämie und Entzündung, kann die BHS geöffnet und die Homöostase des Gehirns gestört werden. Dieses 'Offnen' bedeutet einen erhöhten Einstrom von zuvor reflektierten Substanzen, denen aus osmotischen Gründen Wasser nachfolgt. Es entwickelt sich ein sogenanntes vasogenes Hirnödem (Klatzo [48]), das durch eine Zunahme des cerebralen Wassergehalts gekennzeichnet ist. Bei der Auslösung und Ausbreitung eines vasogenen Hirnödems spielen Mediatoren eine wichtige Rolle, die im Rahmen des pathologischen Geschehens aus dem Hirngewebe (Neuronen und Gliazellen) gebildet und freigesetzt werden. Diese als Gewebshormone (Autacoide) bezeichneten Substanzen induzieren eine Zunahme der Gefäßpermeabilität. Außerdem bewirken die Mediatoren häufig eine Vasodilatation und Erhöhung der Durchblutung, wodurch die Extravasation begünstigt wird, da die treibenden Kräfte für einen 'bulk flow' erhöht werden (Wahl et al. [104]). Autacoide, für die eine Mediatorfunktion bei der Entstehung eines vasogenen Hirnödems nachgewiesen oder wahrscheinlich gemacht wurden sind Bradykinin, Histamin, Arachidonsäure und freie Radikale (Martins et al. [51], Schilling und Wahl [79,81], Unterberg und Baethmann [88], Unterberg et al. [89-92], Wahl et al. [102,105,108,109], Wahl und Schilling [106]). Der Permeabilitätsanstieg beruht meistens auf der Aktivierung spezifischer endothelialer Rezeptoren. Der Weg der Permeabilitätserhöhung ist jedoch noch unklar. Eine Kontraktion der Endothelzellen und damit das Öffnen des

parazellulären Weges, ein erhöhter vesikulärer Transport, Offnung von transzellulären Kanälen und eine Schädigung der Plasmamembran werden diskutiert (Wahl et al. [105,108,109]). Während eine Penetration der Plasmamembran durch polymorphkernige Leukocyten als ein Mechanismus für die Schädigung der BHS durch Arachidonsäure nachgewiesen wurde (Unterberg et al. [91]), dürfte die Bildung von transzellulären Kanälen auf Artefakten beruhen. Auch der vesikuläre Transport, der als ein Mechanismus für die Öffnung der BHS durch Bradykinin und Histamin diskutiert wird, (Literatur siehe Schilling und Wahl [79,81], Wahl et al. [105,108,109], Wahl und Schilling [106]), wird nicht generell akzeptiert (Bundgaard [15]). Hingegen machen neuere Untersuchungen mit Messung des transmuralen Widerstandes wahrscheinlich, daß Bradykinin und Histamin die BHS durch Öffnen von tight junctions zumindest für niedermolekulare Substanzen durchlässig macht (Butt und Jones [17], weitere Literatur bei Schilling und Wahl [79,81], Wahl et al. [105,108,109], Wahl und Schilling [106]).

Im Gegensatz zum vasogenen Odem kommt es beim zytotoxischen Odem nicht zu einer Netto-Wasseraufnahme ins Gehirn, sondern zu einer Wasserumverteilung vom intrazellulären interstitiellen in den Raum auf Grund entsprechender Ionenumverteilungen. Glutamat, hohes Kalium und Acidose sind Beispiele für Mediatoren, die ein zytotoxisches Hirnödem induzieren können (Literatur siehe Wahl und Schilling [107]). Vasogenes und zytotoxoisches Ödem können zum sekundären Hirnschaden führen, der allerdings bei Kenntnis der genauen Pathomechanismen vermeidbar bzw. therapierbar sein sollte. Deshalb ist es auch von klinischem Interesse die Mechanismen, die einem Hirnödem zugrunde liegen, zu untersuchen, um damit rationale Therapieansätze zu entwickeln. Dazu muß man eine Möglichkeit haben, die Zunahme der Gefäßpermeabilität unter verschiedenen Konditionen zu quantifizieren.

Bisher hat man mit verschiedenen Methoden versucht, eine Zunahme der BHS-Permeabilität in vitro und in situ zu messen. Untersuchungen an Endothelzellkulturen, wie sie z. B. im Labor von Goldstein und Betz [39] durchgeführt wurden, haben den Nachteil, daß sie einen geringeren transendothelialen elektrischen Widerstand besitzen als Endothelzellen in vivo. Somit ist fraglich, ob dies ein valides Modell ist, um quantitative Aussagen über die Permeabilität der BHS zu machen. Verschiedene quantitative Methoden zur Messung der Blut-Hirnschrankenpermeabilität in situ beruhen im wesentlichen darauf, daß die Extraktion von im Blut befindlichen Markern aus der arterio-venösen Konzentrationsdifferenz (Crone [21], Hertz und Bolwig [45], Hertz und Paulson [46]) bestimmt oder die Aufnahme von Tracern ins Hirngewebe durch Autoradiographie, Entnahme von Gewebeproben mit Bestimmung von Radioaktivität bzw. Farbintensität oder externe Registrierung der Hirn-Radioaktivität mit Positron-Emissionstomographie ermittelt wird (Grünwald et al. [42,43], Hultström [47], McEachron et al. [55], Oldendorf [60,61], Oldendorf und Szabo [62], Raichle [67], Sokoloff [84,86], Sokoloff et al. [85], Tang et al. [87]). Extracerebrale Kontamination, Verwendung von Referenzsubstanzen, teuere apparative Ausstattung und teilweise nur punktuelle Meßmöglichkeiten können bei diesen Methoden erschwerende Faktoren sein, was bei Pardridge [65] ausführlich diskutiert wird.

Tierexperimentell kann man am offenen Schädel mit Hilfe von Mikroelektroden den transendothelialen elektrischen Widerstand von extraparenchymalen Gefäßen an der Hirnoberfläche messen. Diese erstmals von Crone und Olesen [22,63,64] beim Frosch eingesetzte Methode wurde später auch bei der Ratte angewandt (Abbott und Revest [1], Butt et al. [16], Butt und Jones [17], Revest et al. [70]). Diese Methode ermöglicht allerdings nur, die Durchlässigkeit der BHS und ihre Änderung für geladene Substanzen zu bestimmen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen können zwar die Öffnung der BHS lokalisieren und lassen die Route der Extravasation erkennen, haben aber den Nachteil, daß sie nur einen momentanen Zustand, nicht aber eine Dynamik der Schrankenöffnung erkennen lassen. Außerdem können nur bestimmte Tracer sichtbar gemacht werden und es ist teilweise schwierig Fixationsartekakte auszuschließen (Brightman und Reese [13], Bundgaard [15], Reese und Karnovsky [69]).

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie mit hydrophilen Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlichen Molekulargewichts als Tracer erscheint ein geeignetes Mittel, die Kinetik von Tracerextravasation unter Berücksichtigung der Öffnung von funktionellen Poren zu untersuchen. Dieses Verfahren ist in peripheren Organen von verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich angewandt worden. Bei der Durchleuchtung dünner transparenter Objekte, wie z.B. Hamsterbackentaschen oder Mesenterialgewebe (Aggarwal et al. [2], Bekker et al. [5], Curry et al. [26], Fraser und Dallas [36], Gahm et al. [37], Gawlowski und Durán [38], Ley und Arfors [50], Nugent und Jain [59]), konnten bereits gute Ergebnisse bei der Verwendung intravitaler Fluoreszenzmikroskopie in Verbindung mit Bildverarbeitungsmethoden ermittelt werden. Allerdings bestehen verschiedene Schwierigkeiten, diese Methoden auf das Gehirn zu übertragen:

- Beim Gehirn kann nur mit Auflicht und nicht mit Durchlicht gearbeitet werden. Daraus resultieren schlechtere optische Verhältnisse (Eggert und Blazek [30]).
- Das erfaßte Gewebsvolumen läßt sich nur abschätzen. Dies bedeutet, daß die Extravasation nur relativ erfaßt werden kann.
- Die intraparenchymalen Gefäße des Gehirns, die in vivo nur mit konfokaler Mikroskopie erfaßt werden können (Villringer et al. [95]), erzeugen bei normaler Auflichtmikroskopie einen homogen fluoreszierenden Hintergrund, von denen sich extraparenchymale Gefäße als deutlich hellere Strukturen abheben.
- Das Gehirn unterliegt respiratorischen Schwankungen, die eine ständige Veränderung der Fokusebene und damit auch der aufgenommenen Lichtintensität mit sich bringen.

Durch das Freilegen des cerebralen Cortex mit dem daraufliegenden Gefäßbaum extraparenchymaler Gefäße wird es möglich, in einem cranialen Fenster Anderungen der BHS mit Hilfe von fluoreszierenden Tracern in vivo zu untersuchen. Hierbei kann man einmal die Clearance des Tracers aus den extraparenchymalen Hirngefäßen und zum zweiten die Akkumulation des Tracers ins Gewebe an Hand der 'Leck-Stellen' bestimmen. Mayhan et al. [53] bzw. Mayhan und Heistad [52] bestimmten Tracerextravasation Ermitteln der 'Clearance-Rate' die durch aus der Superfusionsrate und der Tracerkonzentrationen im Superfusat und Plasma bei Anderungen der Permeabilität der BHS. Dadurch erhält man zwar einen guantitativen Wert, das Ergebnis kann jedoch durch Kontamination aus extracerebralen Gefäßen in der Dura oder im Schädelknochen verfälscht sein, da diese Gefäße keine BHS besitzen und eine höhere Permeabilität aufweisen als die cerebralen Gefäße. Mayhan und Heistad [52] haben zwar behauptet, selbst während induzierter Hypertonie niemals Traceraustritt aus extracerebralen Gefäßen entlang des Craniotomiefeldes oder des Durarandes beobachtet zu haben, aber dies kann aus eigenen experimentellen Erfahrungen nicht bestätigt werden. Auch an einzelnen cerebralen Venolen von Frosch und Ratte wurde die Extravasation von verschieden großen fluoreszierenden Tracern aus der intravasalen Intensitätsabnahme nach Gefäßocclusion in situ bestimmt (Easton und Fraser [29], Fraser und Dallas [36]).

Die zweite Vorgehensweise zur Bestimmung der Extravasation beruht auf einem Zählen von Spots, d. h. von klar definierbaren Gewebsregionen stark erhöhter Fluoreszenzaktivität im Gewebe. Verschiedene Autoren haben so die Extravasation in größeren Hirnarealen bestimmt. Hierbei erfolgte ein Abzählen der Extravasationsspots in definierten Bereichen der Gehirnoberfläche. Diese Methode

wurde von Schilling et al. [77], Schilling und Wahl [81], Unterberg et al. [89,91,92] und Wahl et al. [102,104] aber auch von Faraci et al. [32], Mayhan et al. [54] und Mayhan und Heistad [52] benutzt. Dieses semiquantitative Verfahren berücksichtigt jedoch nicht Fläche und Intensität der Extravasationsregionen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durch die rechnergestützte Bildverarbeitung berücksichtigt werden können. Auf Probleme bei der Bildverarbeitung hat schon Bradbury [12] hingewiesen.

Erste Versuche die Extravasationen fluoreszierender Tracer guantitativ zu erfassen, wurden von unserem Labor in Publikationen von Bultmann et al. [14], Findling et al. [34] und Schilling et al. [78] vorgestellt. Das Prinzip der Methode beruht darauf, durch Bildsubtraktion den Gefäßbaum mit den fluoreszierenden Tracern und den homogenen Hintergrund (Background) aus den Aufnahmen der Hirnoberfläche zu SO Öffnung eliminieren, daß bei der BHS im Subtraktionsbild nur Extravasationsareale zu sehen sind, deren Fläche und Intensität densitometrisch erfaßt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, ein automatisiertes Verfahren zu entwickeln, das untersuchtes Gehirnareal zu verschiedenen Tracerextravasationen für ein Zeitpunkten guantifiziert. Dazu wurde das von Bultmann et al. [14] beschriebene Verfahren in wesentlichen Punkten neu gestaltet, indem verschiedene Schritte modifiziert und verbessert, und andere neu hinzugefügt wurden, um die Quantifizierung der Tracerextravasationen möglichst exakt berechnen zu können. Dabei sollten für alle Schritte des Auswerteprogramms verschiedene Möglichkeiten entwickelt und getestet und die jeweiligen Parameter optimiert werden. Im einzelnen sollte die Bilddigitalisierung automatisiert und verbessert werden; für die Bildvorverarbeitung sollten neue Verfahren der Shadingkorrektur entwickelt und gegeneinander getestet werden. Das Verfahren der Strukturelimination, sollte parametrisiert und verbessert werden. Für bekannte Probleme, wie z. B. die Helligkeitsschwankungen Testbildreihen. verschiedene von sollten neue Korrekturverfahren gefunden und getestet werden. Neue Verfahren, wie etwa die Elimination von Restflächen des oberflächlichen Gefäßbaums. die eine Verbesserung des Ergebnisses herbeiführen könnten, sollten integriert werden. Die verschiedenen Lösungsmöglichkeiten sollten anschließend miteinander verglichen werden, indem verschiedene Variationen des gesamten Verfahrens gegeneinander getestet werden, und so ein optimiertes Verfahren zur Quantifizierung der Extravasation von fluoreszierendem Tracer ermittelt wurde. Dieses Verfahren sollte zuletzt anhand definierter Versuchszustände verifiziert werden. Teile dieser Dissertation wurden bereits in Findling et al. [35] veröffentlicht.

2. Methodik

2.1. Operative Eingriffe

Die Versuche wurden an narkotisierten Katzen beiderlei Geschlechts durchgeführt (Körpergewicht: 2,5 - 4,0 kg). Die operativen Eingriffe wurden von den Herren Prof. Dr. M. Wahl und Priv. Doz. Dr. L. Schilling durchgeführt. Die Versuchstiere wurden nach Prämedikation mit Azepromazinmaleat (3 mg/kg i.m.) mit α-Chloralose (40 - 50 mg/kg i.v.) narkotisiert, so daß sie im weiteren Versuchsablauf keine Schmerzen empfinden können. Am Versuchsende wurden die Tiere mit einer Überdosis Nembutal eingeschläfert.

Bei Versuchsbeginn wurde die Luftröhre kanüliert und in die Arteria und Vena femoralis wurden beiderseits jeweils zwei Katheter gelegt. Dabei dienten die arteriellen Katheter zur Blutdruckmessung und zu den versuchsbegleitenden Blutabnahmen. In den Blutproben wurden Säure-Basen-Status (AVL 939, AVA, Graz, Osterreich) und Fluoreszenzintensität gemessen. Die gemessenen Werte für den Säure-Basen-Status waren (Mittelwert ± Standardabweichung): Blutdruck, 15 ± 1,7 kPa $(112,5 \pm 12,5 \text{ mmHg});$ endexspiratorische CO₂-Konzentration, 4,2 ± 0,2 vol%; pH, 7,38 ± 0,06; PCO₂, 3,7 ± 0,6 kPa (27,7 ± 4,3 mmHg); PO₂, 16,3 ± 0,8 kPa (122,3 ± 6,1 mmHg). Die venösen Katheter dienten dagegen zur Relaxation der Katze durch eine kontinuierliche Infusion sowohl von Pancuroniumbromid (0,7 - 0,85 mg/(kg*h) i.v.), als auch von Ambroxol (7,5 mg/h) zur Sekretolyse, und zur Tracerinjektion. Die Pharmaka wurden mit Tyrode-Lösung verdünnt, die Tracer wurden in 0,9 % NaCI-Lösung gelöst. Insgesamt wurden 1,7 ml/(kg*h) infundiert. Die Tiere wurden maschinell beatmet (Servo Ventilator 900B, Dräger, Lübeck, Deutschland), um eine stabile endexspiratorische CO₂-Konzentration zu erhalten. Diese wurde mit einem EGM1-Kapnolyser (EGM 1, Heyer, Bad Ems, Deutschland) gemessen.

Die Kopfhaut wurde paramedian eröffnet und an einem Metallring vernäht (Wahl et al. [104]). Damit wurde ein äußerer Wall zur Überschichtung des Schädels mit Paraffinöl geschaffen. Über dem linken parietalen Cortex wurde mit einem langsam laufenden gekühlten Zahnarztbohrer eine ca. 2,5 cm * 1,5 cm Trepanation angelegt. Um diese Region wurde mit einem schnell polymerisierenden Zahnzement (Paladur, Kulzer, Bad Homburg, Deutschland) ein Wall errichtet. In diesem Wall wurden zur corticalen Superfusion (20 ml / 30 min) drei Katheter (1 Influx, 2 Effluxe) einzementiert. Um die Hirnoberfläche vor dem Austrocknen zu schützen, wurde sie mit vorgewärmten Paraffinöl (37 ℃) überschichtet. Dann erfolgte nach Ligatur großer Duragefäße die Eröffnung der Dura. Die Arbeiten fanden unter einem Operationsmikroskop (Zeiss, Wetzlar, Deutschland) statt. In der Abbildung 2.1. ist ein Schema zur corticalen Superfusion dargestellt.



Abbildung 2.1.: Schema zur corticalen Superfusion modifiziert nach Wahl et al.

[104]

2.2. Verwendete Lösungen

Die künstliche Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), die als Lösungsmittel verwendet wurde, hatte folgende Zusammensetzung (mM): Na⁺, 159,5; K⁺, 2,5; Ca²⁺, 1,5; Cl⁻, 150,5; HCO₃⁻, 14,5; Glukose, 3,3. Die Lösung wurde kontinuierlich mit einem Gemisch von 5 % CO₂, 12 % O₂, 83 % N₂ begast. Bei 37 °C hatte die Lösung einen pH-Wert von 7,25 und eine Osmolarität von 308 mosmol/l. FITC-Dextran (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) hat folgende physikalisch-chemischen Eigenschaften: mittleres Molekulargewicht, 71200; Anzahl der mittleren Molekulargewichte, > 57000; Substitutionsgrad, 0,01; Einstein-Stokes'scher Radius, 5,8 nm nach Nugent und Jain [59]. Na⁺-Fluoreszein (Merck, Darmstadt, Deutschland) hat ein mittleres Molekulargewicht von 376 und einen Einstein-Stokes'scher Radius von 0,48 nm.

2.3. Tracerinfusion und corticale Superfusion

Um eine konstante Plasmakonzentration der Tracer zu erhalten, wurde nach der Tierpräparation ein Bolus von 1,3 ml/kg einer 5 % FITC-Dextran Lösung (gelöst in isotonischer Kochsalzlösung) infiziert. Anschließend wurde eine kontinuierliche Infusion von 0,85 ml/(kg*h) einer 1,25 % Lösung gegeben (Bultmann et al. [14], Findling et al. [35], Schilling et al. [78]). Na⁺-Fluoreszein wurde in einen Bolus von 1-1,5 ml/kg einer 2 % Na⁺-Fluoreszein Lösung (gelöst in isotonischer Kochsalzlösung) gegeben, dem eine kontinuierliche Infusion von 0,85 ml/(kg*h) einer 1 % Lösung folgte.

Zur corticalen Superfusion (20 ml / 30 min) wurden je nach Versuch Nikotin, Adenosin oder Histamin in aufsteigenden Konzentrationen appliziert, die in künstlichem Liquor (CSF) gelöst waren. Diese Substanzen können vasomotorische Reaktionen, vorwiegend an den Arterien, aber auch an den Venen, und Extravasation induzieren (Findling et al. [35], Gawlowski und Durán [38], Mooradian [57], Schilling und Wahl [79,81], Schilling et al. [78], Wahl [103], Wahl und Kuschinsky [97,98,100,101]). Der zeitliche Ablauf ist in Abbildung 2.2. dargestellt.

Die Extravasation wurde mit dem Austritt von Tracer aus Gefäßen bestimmt und ist ein Indikator für die Öffnung der Bluthirnschranke. Dabei öffnen sich, je nach Substanz, unterschiedlich große funktionelle Poren, die daher verschieden große Tracer austreten lassen, deren Größe abhängig von dem gewählten Dextranmolekül ist. Die Extravasation erfolgt vorwiegend im Bereich von Venolen und Venen. Ob bei großflächigen massiven Extravasationen auch ein Traceraustritt aus Arteriolen erfolgt, kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen nicht beurteilt werden.

2.4. Technischer Versuchsablauf und Bildgewinnung

Das Beobachtungsareal auf der Gehirnoberfläche wurde in vier bis sechs Felder unterteilt, die über einen programmierbaren in x- und y-Richtung verfahrbaren Kreuztisch (Märzhäuser MAC4000, Wetzlar, Deutschland), auf dem das Untersuchungsobjekt lag, angefahren wurden. Diese Felder wurden durch eine externe Quecksilberlampe (HBO 50 Watt Hochdruck-Lampe, Osram, Augsburg, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 450 - 495 nm angeregt. Ein I2-Filterblock (Leitz, Wetzlar, Deutschland) trennt das Anregungslicht vom emittierten Licht der Wellenlänge über 515 nm. Da durch respiratorische Schwankungen der Hirnoberfläche in dem offenen Schädelfenster Unschärfen bzw. geringgradige Bildverschiebungen entstehen, wurden die Felder jeweils während inspiratorischer Plateaus aufgenommen, die vom Respirator (Servo Ventilator 900B, Dräger, Lübeck, Deutschland) durch eine 1,5 s dauernde Konstanz des Beatmungsdruckes erzeugt wird. Während dieser Zeitspanne sorgt ein vom Respirator gesteuerter Shutter für die Belichtung der aufzunehmenden Hirnoberfläche, die ansonsten unbeleuchtet ist. Die Felder der Hirnoberfläche wurden mit einer SIT-Kamera (silicone intensifier target, C 2400-08, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland), die auf ein Zoom-Makroskop (M400, Wild, Heerbrugg, Schweiz) aufgesetzt ist, aufgenommen und über einen Kameraverstärker (Gain und Sensitivity immmer konstant) auf einem U-matic SP-Videorekorder (VO-9600P, Sony, Köln, Deutschland) aufgezeichnet. Ein zweiter Ausgang des Kameraverstärkers ist an einen Videomonitor (Bosch T38BC, Stuttgart, Deutschland) zur Versuchsbeobachtung angeschlossen. Die SIT-Kamera liefert 500 Fernsehzeilen bei einer Frequenz von 25 Einzelbildern pro Sekunde. Die Empfindlichkeit beträgt ungefähr 10⁻⁴ lux bei 450 nm; der Signal-Rausch-Abstand beträgt 40 db.

Die zu Beginn der eigentlichen Meßphase ausgewählten Untersuchungsareale wurden im weiteren Verlauf des Versuchs zu festgelegten Zeiten untersucht. Vor jedem Aufnahmezeitpunkt wurde die räumlichen Verteilung des Emissionslichtes in vitro aufgezeichnet. Diese Aufzeichnungen werden im folgenden mit 'in vitro'-Bildern bezeichnet. Dabei wurde die Tracerintensität in einem Eppendorfgefäß aufgenommen, um die ungleichmäßige, annähernd kegelförmige Lichtverteilung der Quecksilberlampe in der Versuchsauswertung berücksichtigen zu können. Zu jedem interessierenden Zeitpunkt wurden somit das Eppendorfgefäß und die Felder aufgenommen, wobei jede Aufnahme in 40- und in 76-facher Vergößerung aufgezeichnet wurde. Die stärker vergrößerten Aufnahmen (kleinerer Bildausschnitt) dienten dabei lediglich zur Messung der Gefäßdurchmesser. In Abbildung 2.2. ist der zeitliche Versuchsablauf dargestellt.



Abbildung 2.2.: Zeitlicher Versuchsablauf

Der Teststoff wird in 10-fachen Konzentrationssteigerungen appliziert (1. - 4. Applikation).

Der erste Aufnahmezeitpunkt diente zum Aufzeichnen der Referenzbilder. Die Hirnoberfläche ist dabei nur von Paraffinöl bedeckt. Danach wurde zunächst künstlicher Liquor superfundiert, um seine Wirkungen alleine zu bestimmen. Die ausgewählten Areale wurden nach einer, nach 15 und nach 30 Minuten aufgezeichnet. Nach dieser Zeit wurde eine der oben genannten Substanzen, die im künstlichem Liquor gelöst waren, auf die Hirnoberfläche appliziert. Bei jeder Konzentrationsstufe wurde ebenfalls nach einer, 15 und nach 30 Minuten aufgezeichnet, bevor eine jeweils 10-fach höhere Konzentration appliziert wurde (siehe Abbildung 2.2.).

Bei den Auswertungen in Kapitel 13. wurden die Tracerintensitätsänderungen im Plasma bezogen auf die Probe, die kurz vor Aufnahme des Referenzbildes genommen wurde. Die Gefäßdurchmesseränderungen während der Superfusion von künstlichem Liquor wurden auf den Mittelwert der Messungen unter Paraffinöl bezogen. Die darauffolgenden Messungen wurden auf die zeitlich entsprechende Messung unter künstlichem Liquor bezogen und sind in Prozent zu diesem Kontrollwert angegeben.

2.5. Gefäßdurchmessermessung

Da zahlreiche Substanzen, die eine Extravasation bewirken, auch vasomotorische Effekte auslösen (Unterberg und Wahl [93], Wahl et al. [104,105,108,109]), war es notwendig, den Durchmesser von Arterien und Venen zu messen.

Als Bildgrundlage dienen die 76-fach vergrößerten Aufnahmen, damit die relativ kleinen Längen in einer höheren Auflösung gemessen werden können. Je Feld werden nun einige Gefäße ausgewählt, deren Durchmesser ermittelt werden sollen. Der Bildausschnitt, in dem diese interessierenden Gefäße liegen, wird zur Messung zusätzlich um den Faktor zwei vergrößert. Mit zwei Punkten wird ein Rand eines Gefäßes markiert, um die Verlaufsrichtung dieses Gefäßes festzuhalten. Die so entstandene Gerade markiert nun eine Seite des Gefäßes. Mit einem dritten Punkt wird jetzt die gegenüberliegende Seite des Gefäßes markiert. Von diesem Punkt wird ein Lot auf die vorher ermittelte Gerade gefällt und deren Länge berechnet, die den Durchmesser des Gefäßes darstellt. In Abbildung 2.3. ist ein Schema zur Gefäßdurchmessermessung dargestellt. Der Meßort an den Gefäßen muß selbstverständlich in einem Feld zu jedem Zustandszeitpunkt identisch sein, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.



Abbildung 2.3.: Schema zur Gefäßdurchmessermessung

Das im Labor etablierte Verfahren (Bultmann et al. [14] und Schilling et al. [78]) wurde von mir dahingehend modifiziert, daß nun der dritte Punkt frei bewegt werden kann. Durch diese Verbesserung wurde es möglich, auch waagrecht verlaufende

Gefäße zu messen. Außerdem wird nun die gemessene Strecke in µm angegeben und nicht wie bisher in Pixel. Damit wurde auch dem ungleichen Pixelseitenverhältnis Rechnung getragen.

2.6. Messung der Plasmaintensität

Wichtig für die Verifikation des unten beschriebenen Verfahrens ist die Konstanz der Konzentration des fluoreszierenden Tracers im Blutplasma. Dazu wurden während des Versuchs Plasmaproben entnommen, deren Fluoreszenzintensität später, d.h. 'offline', gemessen wurde. Aus früheren Versuchen (Schilling et al. [78]) waren die Infusionsraten bekannt, die für die Einstellung einer konstanten Plasmakonzentration erforderlich sind. Kleine Schwankungen, die während eines Versuches auftreten, wurden durch den Helligkeitsangleich (siehe Kapitel 7., Seite 71) im unten beschriebenen Verfahren ausgeglichen.

Die Plasmaproben wurden mit NaCl 1:100 verdünnt. Davon wurde 1 ml in eine Küvette gegeben und auf gleiche Weise über die Kamera aufgenommen, wie es im oben beschriebenen Versuch geschildert wurde. Dann wurde 'online' die mittlere Intensität des auf dem Bildschirm erscheinenden Bildes gemessen. Diese Messung wurde dreimal wiederholt und die Meßwerte wurden gemittelt.

Die Linearität dieses Verfahrens konnte sowohl für FITC-Dextran, wie auch für Na⁺-Fluoreszein auf gleiche Art mit Eichkurven nachgewiesen werden, die täglich zur quantitativen Bestimmung der Plasmaproben erstellt wurden. Eine lineare Beziehung zwischen Helligkeit und FITC-Dextran-Konzentration konnten in ähnlicher Weise auch Armenante et al. [3] und Witte [110] feststellen. Die folgenden zwei Eichkurven wurden beispielhaft ausgewählt. Die Linearität bei FITC-Dextran ist in Abbildung 2.4. dargestellt, die bei Na⁺-Fluoreszein in Abbildung 2.5..







Abbildung 2.5.: Eichkurve für Na+-Fluoreszein

Für die Werte in den Abbildungen 2.4. und 2.5. wurden auch die Standardabweichungen der jeweils drei Messungen berechnet. Sie sind jedoch so gering, daß sie bei dem oben gezeigten Maßstab nicht sichtbar sind. Die Geraden wurden durch Regression mit dem Programm 'GraphPad' unter MS-DOS ermittelt. Der Korrelationskoeffizient für die Regressionsgerade bei FITC-Dextran beträgt 0,9848, der für die Regressionsgerade bei Na⁺-Fluoreszein beträgt 0,9979. Der etwas kurvenförmige Verlauf bei FITC-Dextran ist typisch und reproduzierbar für diese Eichkurve. Dies kann auf eine Ungenauigkeit bei der Herstellung der Grundlösungskonzentrationen zurückgeführt werden, die jedoch nicht geändert wurde, um für jeden Meßtag vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Die Linearität zwischen FITC-Dextran Konzentration und der oben beschriebenen Bildmittelwertmessung bzw. zwischen FITC-Dextran Konzentration und der Messung mit einem Fluoreszenz-Spectral-Photometer (PMQ3, Zeiss, Oberkochem, Deutschland) ist in der folgenden Abbildung 2.6. dargestellt und wurde von Findling et al. [35] publiziert.



Abbildung 2.6.: Vergleich der Messungen der FITC-Dextran Konzentration durch Berechnung des Bildmittelwerts und mit einem Fluoreszenz-Spectral-Photometer

Der Korrelationskoeffizient für die Regressionsgerade der oben beschriebenen Messung durch Berechnung des Bildmittelwerts beträgt 0,991, der für die Regressionsgerade der Messung mit dem Fluoreszenz-Spectral-Photometer beträgt 0,983.

2.7. Statistik

In den Abbildungen 13.1. bis 13.11. ist der Mittelwert mit dem Standardfehler (SEM) als Schwankungsbereich angegeben. Die Signifikanz wurde mit dem Programm

"SPSS for Windows 5.0" ermittelt. Es wurde eine Einfache Varianzanalyse (ANOVA One-Way-Variance) mit folgendem 'Multiple Range Test' gerechnet:

- least-significant difference Test (LSD)

In die Abbildungen wurden die Ergebnisse des LSD-Testes eingetragen. Das Signifikanzniveau **p** liegt bei 0,05.

3. Systembeschreibung

3.1. Hardware

Die Bilder wurden analog mit dem U-matic SP-Videorecorder VO-9600P aufgezeichnet. Die Aufzeichnung der Bilder lief über einen Frame Code Generator (Sony FCG-700, Köln, Deutschland), um jedes einzelne Bild eindeutig identifizieren zu können. Der Videorecorder war zusätzlich mit einer seriellen Schnittstelle (Sony BKU-701, Köln, Deutschland) ausgestattet, mit der dieser mit dem unten beschriebenen Rechner verbunden war. In früheren Versuchen wurde ein Zeit-Datum-Generator (Panasonic WJ-810, Hamburg, Deutschland) anstatt des Frame Code Generator verwendet. Die Einblendung eines Datums stellte jedoch für die quantitative Bildanalyse einen Artefakt dar, so daß dieses Gerät später nicht mehr verwendet wurde. Stattdessen wurden dann während des Versuchs alle Einzelheiten wie Datum, Uhrzeit, Zustand etc., auf die Tonspur des Videobandes gesprochen.

Zur Weiterverarbeitung stand zunächst ein IBM-kompatibler AT-Personalcomputer vom Typ Vectra RS/16 (Hewlett-Packard, Bonn, Deutschland) mit einem Intel 80386 Prozessor und einem 80387 Co-Prozessor zur Verfügung. Dieser Rechner arbeitete mit einer Taktfrequenz von 16 MHz und war mit 640 MByte Festplattenkapazität und einem Bandlaufwerk mit unkomprimierten 120 MByte Kapazität ausgestattet. Weiterhin besaß der Rechner eine Bildkarte vom Typ Itex FG-100 (ITI, Woburn, USA) und einen daran extern angeschlossenen RGB-Monitor (Barco CD233, Kortrijk, Belgien). Die Bildkarte hatte einen Bildspeicher von 1024 * 1024 Bildpunkten mit einer Tiefe von 8 Bit.

Dieser Rechner wurde später gegen einen ebenfalls IBM-kompatiblen Rechner (proCAT-Computer, München, Deutschland) ausgetauscht. Der neue Rechner besaß einen Intel 80468DX2 Prozessor mit 66 MHz Taktfrequenz und benötigte für die Berechnungen rund ein Fünftel der vorher benötigten Zeit. Festplatte, Bandlaufwerk, Bildkarte und Monitor wurden beibehalten. In Abbildung 3.1. ist der Aufbau schematisch dargestellt.





3.2. Software

Die Realisierung der Algorithmen wurde in der Programmiersprache C durchgeführt. Dabei wurde der Turbo C++ Compiler Version 1.0 von Borland (Scotts Valley, Kalifornien, USA) verwendet, der die Programme im Huge-Modell kompiliert. Die Programme liefen unter dem Betriebssystem MS-DOS 6.0 (Microsoft Disk Operating System Version 6.0) (Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland).

In Abbildung 3.2. ist der schematische Ablauf der Bildanalysen mit den wesentlichen Schritten dargestellt. Die einzelnen Punkte werden in dieser Arbeit ausführlich behandelt.



Abbildung 3.2.: Schematischer Programmablauf

Zur Referenzbild- und Testbildvorverarbeitung gehören z. B. Shadingkorrektur, Lagekorrektur oder Helligkeitsangleich; zur Subtraktionsbildnachbearbeitung gehören z. B. Rauschminderung und Verfahren der Struktur- und Flächenelimination. Diese Verfahren werden in Kapitel 6.ff beschrieben.

3.3. Bildformat

Die Bilder lagen in einem Format von 503 Spalten * 512 Zeilen vor. Eigentlich hätte das Format 512 * 512 Pixel betragen müssen. Wegen eines Hardwaredefekts auf der Bildkarte waren allerdings nur 503 * 512 Pixel nutzbar. Jeder Pixel konnte die Grauwerte von 0 bis 255 annehmen. Hierbei repräsentiert der Grauwert 0 'dunkel' und 255 'hell'. Die Bildpunkte standen in einem Seitenverhältnis von 1/1,543 (Höhe zu Breite). Die reale Pixelbreite betrug bei einer 40-fachen Vergrößerung, in der die zu bearbeitenden Bilder vorlagen, 12,2 μ m. Die entsprechende Pixelhöhe betrug real 7,91 μ m. Bei 76-facher Vergrößerung (zur Messung der Gefäßdurchmesser) betrug die reale Pixelbreite 6,42 μ m und die reale Pixelhöhe 4,16 μ m.

Ein Bild wurde bei den meisten Berechnungen im RAM (Random Access Memory) des Computers gehalten, um die Rechenzeit zu verkürzen. Bis zu vier weitere benötigte Bilder konnten dann im Bildspeicher der Bildkarte abgelegt und bearbeitet werden.

4. Voruntersuchungen

4.1. Allgemeines

Um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Untersuchungen zu gewährleisten, war es nötig, einige Punkte genauer zu beleuchten. Ziel war es dabei zu zeigen, daß der Einfluß dieser Punkte auf die Bilddaten nicht in die Auswertung eingeht, da er von Bild zu Bild - zumindest innerhalb eines Versuchs - vergleichbar war. Diese Punkte waren zum einen die Stabilität des Anregungslichtes und zum anderen das Fadingverhalten des verwendeten Tracers, d.h. eine eventuell vorhandene Abschwächung des Fluoreszenzverhaltens.

Die folgenden Ergebnisse wurden zum Teil bereits in Findling et al. [35] vorgestellt.

4.2. Stabilität des Anregungslichtes

Zur Untersuchung der Stabilität des Anregungslichtes, das von der Quecksilberhochdrucklampe geliefert wurde, wurde eine lichtempfindliche Diode (Eigenherstellung) mit einer Fläche von 1 mm² anstelle des Versuchsobjektes unter das Makroskop gelegt. Die gemessene Lichtstärke wurde verstärkt und von einem Meßschreiber aufgezeichnet. Anschließend wurden die Daten in den Computer eingegeben und die relativen Intensitätsänderungen berechnet. So wurden vier Messungen mit maximal vier Stunden Meßdauer durchgeführt. Da die Lampe bei den Versuchen eine Stunde vor den Bildaufzeichnungen eingeschaltet wurde, wurde erst eine halbe Stunde nach Einschalten der Lampe mit der Messung begonnen. Es zeigte sich aber auch, daß die Lampe schon nach wenigen Minuten ihre Stabilität erreicht hatte. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.1. dargestellt.



Abbildung 4.1.: Stabilität des Anregungslichtes

Man erkennt daß die Schwankungen des Anregungslichtes nur sehr gering sind (< 5%). Einzig bei Experiment 2 entdeckt man Ausreißer, die auf eine alte und verbrauchte Lampe zurückgeführt werden konnten. Diese Lampe wurde daraufhin ausgetauscht.

4.3. Background-Intensität

Die Bilder, die von der Kamera aufgenommen werden, zeigen auch außerhalb des sichtbaren Gefäßbaums eine gleichmäßige Fluoreszenz, den 'Background'. Dieser wird durch fluoreszierenden Tracer in den intraparenchymalen Blutgefäßen der oberen corticalen Schichten hervorgerufen. Die Eindringtiefe des Anregungslichtes erhöht sich mit einer Wellenlänge des Anregungslichtes oberhalb von 360 nm (Eggert und Blazek [30]). Da es sehr schwierig ist, die Eindringtiefe im lebenden Gehirn zu bestimmen, wird für sichtbares Licht eine Eindringtiefe (das ist die Tiefe, in der die optische Leistung auf 37 % gesunken ist (Eggert und Blazek [30])) von 0,5 mm auf Grund der Messungen von Eggert und Blazek [30] angenommen.

4.4. Fading

Als Fading bezeichnet man das Verblassen eines fluoreszierenden Stoffes bei dauerhafter Beleuchtung mit dem Anregungslicht. Auch der Tracer ist diesem Verhalten unterworfen. Daß dies aber bei unseren Versuchen keine Rolle spielt, sollen folgende Untersuchungen darlegen.

4.4.1. Durchlaufbeleuchtung

Um das Fadingverhalten des Tracers im fließenden Blutes zu simulieren, wurde unter dem Mikroskop ein lichtdurchlässiger PVC-Schlauch (Innendurchmesser ca. 1 mm; angeregtes Volumen ca. 18 mm³) kontinuierlich mit Na⁺-Fluoreszein (in 0,9 % NaCl gelöst) perfundiert. Es wurde ein Reservoir von 200 ml angelegt. Ein einmaliger Durchlauf des gesamten Reservoirs innerhalb einer Stunde simuliert dabei annähernd eine Durchflußrate, wie man sie bei einem großen Hirngefäß einer Katze erwarten darf. Die Beleuchtungsart und -intensität entsprach der eines in situ Versuchablaufs. Das unter diesen Bedingungen beleuchtete Tracervolumen entspricht ungefähr dem eines Beobachtungsareals im Kraniotomiefeld bei kontinuierlicher Beleuchtung.

Nach einer Versuchsdauer von über drei Stunden konnte in vitro keine Abnahme der Intensität festgestellt werden. Aus dieser Simulation kann man folgern, daß für den intravasal fließenden Tracer ein Fading nicht meßbar ist, da die Verweilzeit des Tracers unter dem Anregungslicht sehr gering ist, bzw. die Fraktion des Plasmavolumens, die bei einer Hirnpassage excitiert wird, sehr niedrig ist. Wie weit das auch für extravasierte Tracermoleküle gilt, kann mit dieser Simulation nicht abgeschätzt werden.

4.4.2. Dauerbeleuchtung

In einer zweiten Untersuchung wurde der Tracer (FITC-Dextran) einer dauerhaften Anregung ohne Tracerbewegung unterzogen, um das Fading in einer Extravasation mit statischem Tracer zu simulieren. Währenddessen wurde alle 5 Sekunden ein Bild digitalisiert. Dabei wurden drei verschiedene Tracermengen (200 μ l, 400 μ l und 1000 μ l) untersucht, die jeweils in eine Küvette gegeben wurden. Das Ergebnis zeigt Abbildung 4.2..



Sekunden nach Anregungsbeginn

Abbildung 4.2.: Fadingverhalten bei Dauerbeleuchtung

Man kann erkennen, daß das Verhalten zwar von Versuch zu Versuch schwankt, aber die relative Intensitätsabnahme nicht von der beobachteten Tracermenge abhängt, da die Messungen bei 200 µl und 1000 µl sehr eng beieinander liegen. Bei einer Beleuchtung von ca. 100 Sekunden innerhalb einer Stunde während eines Versuches (4 Felder, 6 Aufnahmezeitpunkte, 2-mal Beleuchtung zum Focusieren + 1 Aufnahme 40-fach + 1 Aufnahme 76-fach, 1 Sekunde je Beleuchtung \Rightarrow 4*6*(2+1+1)*1s=96s) ergibt sich für einen Versuch über drei Stunden eine Gesamtbeleuchtungszeit von 300 Sekunden. Allerdings dürfen diese Ergebnisse nur für statischen Tracer verwendet werden. Dies ist bei Extravasationen der Fall, die jedoch erst gegen Versuchsende auftreten, so daß man großzügig eine Stunde Reaktionszeit für den statischen Tracer ansetzen kann (entspricht 100 s Anregungszeit). Der nachfließende Tracer bleibt jedoch auch davon unbeeinflußt. Wenn man dann die relativ lange Beleuchtungspause während eines in vivo Versuchs von durchschnittlich 10 Minuten berücksichtigt, in der nicht angeregter Tracer nachfließen kann, kann man folgern, daß Fading unter unseren Versuchsbedingungen auch in den Extravasationsarealen von untergeordneter Bedeutung ist und bei der quantitativen Analyse nicht berücksichtigt werden muß.

5. Digitalisierung

5.1. Allgemeines

Um die auf Band aufgezeichneten Bildsequenzen mit Hilfe eines Computers verarbeiten zu können, mußten diese in eine dem Computer verständliche Form gebracht werden. Dazu wurden die interessierenden Bilder mit Hilfe der Bildkarte FG-100 digitalisiert, d.h. die zunächst auf dem Band aufgezeichneten analogen Bilder wurden in einzelne Bildpunkte (Pixel) zerlegt, die jeweils einen Grauwert (Graustufe, Helligkeitswert, Intensität) repräsentieren. Dieser Grauwert kann 256 verschiedene Werte annehmen (0-255), d.h. die Bilder besitzen eine Tiefe von 8 Bit (2⁸=256). Dabei stellt 0 den dunkelsten und 255 den hellsten Grauwert dar. Ein Bild besteht aus 512 Zeilen und 503 Spalten, da wegen eines Hardwarefehlers einige Spalten wegfielen.

5.2. Rauschminderung durch Mittelung

Die Bilder wurden analog von der Videokamera erfaßt, danach analog verstärkt, transportiert, auf Band aufgezeichnet, wiedergegeben und erst von der Bildkarte digitalisiert. Durch all diese analogen Verarbeitungsschritte überlagerte sich den Bildern ein Rauschen, das sich durch alle folgenden digitalen Verarbeitungsschritte zog. Es war daher notwendig, bereits zu Beginn der Auswertung rauschmindernde Verfahren einzufügen.

Gleich zu Beginn wurde daher nicht <u>ein</u> Bild aus einer Bildsequenz digitalisiert, sondern es wurden mehrere Bilder der gleichen Sequenz digitalisiert und zu einem resultierenden Bild laut folgender Formel 5.1. gemittelt:

$$I(x,y) = \frac{\sum_{i=1}^{z} I_i(x,y)}{z}; \text{ für alle Bildpunkte } (x,y)$$

z = Anzahl der zu mittelnden Bilder;

I(x,y) = Intensität des resultierenden Bildpunktes (x,y); $I_i(x,y) =$ Intensität des Bildpunktes (x,y) des digitalisierten Bildes i (i=1,...,z);

Formel 5.1.: Bildmittelung

Da die Werte für **I**(**x**,**y**) nur ganzzahlig sein können, wurden diese gerundet. Das in Kapitel 5.3. beschriebene automatische Verfahren, das bereits von Bultmann et al. [14] und Findling et al. [34,35] verwendet wurde, ermöglicht es, zehn (**z=10**) direkt aufeinanderfolgende Einzelbilder einer Bildsequenz zu mitteln, während es in einem früheren Verfahren (Schilling et al. [78]) nur möglich war, vier Bilder (**z=4**) zu mitteln, die nicht zwangsläufig direkt aufeinanderfolgen mußten.

Abgesehen von der Rauschminderung bewirkt die Mittelung mehrerer Bilder eine Homogenisierung von Bewegungen innerhalb der Gefäße, so daß diese als homogene Strukturen erkennbar sind.

Abbildung 5.1. zeigt, daß eine Mittelung über zehn Bilder rauschmindernder wirkt als eine Mittelung über vier Bilder, da die Funktion der zehnfach gemittelten Bilder enger um den Mittelwert verläuft, der hier bei dem Grauwert von ca. 51 liegt, als die Funktion der vierfach gemittelten Bilder. Dabei wurden aus einer Bildsequenz, die bei geschlossenem Aufnahmeweg (Verdunkelung der Kamera) aufgenommen wurde, zehn bzw. vier Bilder gemittelt. Die Histogramme der resultierenden Bilder sind in Abbildung 5.1. logarithmisch aufgetragen. Nullwerte sind nicht eingetragen.



Abbildung 5.1.: Histogramme gemittelter Bilder

Da es sich bei den Bildern um lichtlose Aufnahmen handelt, kann man direkt den Rauschbereich ermitteln, da das Rauschen um den Mittelwert der Bilder schwankt. Dazu wurde der Mittelwert als Näherung auf den Grauwert 51 gesetzt und davon ausgehend der Prozentsatz aller Pixel ermittelt, der sich innerhalb einer Schranke um den Mittelwert befindet. Eine Schranke von z.B. 4 beinhaltet alle Pixel im Bereich von 51-4=47 bis 51+4=55 (jeweils einschließlich). Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle 5.1. dargestellt:

Schranke	10-fach gemittelt	4-fach gemittelt (z=4)	
	(z=10)		
0	57.09105 %	53.7288 %	
1	98.26626 %	97.0474 %	
2	99.88002 %	99.78372 %	
3	99.99573 %	99.93981 %	
4	99.99922 %	99.96661 %	
5	100 %	99.98214 %	
6	100 %	99.99146 %	
7	100 %	99.99612 %	
8	100 %	99.99884 %	
9	100 %	99.99884 %	
10	100 %	99.99961 %	
11	100 %	100 %	

Tabelle &	5.1.:	Rausch	bereiche
-----------	-------	--------	----------

Man sieht, daß sich schon innerhalb der Schranke 2, gleichgültig ob vierfach oder zehnfach gemittelt wurde, ca. 99,8 % aller Pixel befinden, das heißt das Rauschen bewegt sich zum Großteil um ± 2 um den eigentlichen Grauwert und bleibt damit sehr gering. Bei der Zehnfachmittelung sind alle Bildpunkte innerhalb der Schranke von 5. Im Gegensatz dazu ist bei der Vierfachmittelung dieser Zustand erst bei einer Schranke von 11 erreicht. Daher ist die Zehnfachmittelung der Vierfachmittelung vorzuziehen.

5.3. Automatisches Digitalisierungsverfahren

Beim bisherigen Digitalisierungsverfahren mußte man das Video beobachten und manuell die Speicherung (Einfrieren) des Bildes an passender Stelle, d.h. wenn die zu digitalisierende Sequenz zu sehen war, anordnen. Dieses und drei darauffolgende Bilder wurden in dem 1024*1024 Pixel großem Speicher der Bildkarte eingefroren und danach zu einem Bild laut Formel 5.1. gemittelt. Die

Nachteile dieses Verfahrens sind zum einen, daß nur vier Bilder gemittelt werden, und zum anderen, daß jedes Bild manuell gespeichert werden muß.

Während in der Anfangsphase der Versuche ein U-matic Videorecorder (JVC, Model CR-6650E) verwendet wurde, wurde später ein Videorecorder des Typs Sony VO-9600P benutzt. Die Verwendung des Sony-Videorecorders mit einem Frame-Code-Generator Sony FCG-700 und einer seriellen Schnittstelle Sony BKU-701 brachte mehrere Vorteile:

- Das Videoformat U-matic SP besitzt einen beseren Signal-Rauschabstand als das bisher verwendete U-matic-Format. Zusätzlich kann aber auch das alte Videomaterial in U-matic abgespielt werden.
- Bei der Aufzeichnung wird über den Frame-Code-Generator jedem Bild ein Frame-Code, d.h. eine Nummer, zugeordnet, die dann unabhängig von der aktuellen Bandposition gefunden werden kann, da sie absolut ist. So kann man jedes Bild über diese zugeordnete Zahl eindeutig auffinden.
- Mit der RS-232C-kompatiblen Schnittstelle ist es möglich, den Videorecorder über die serielle Schnittstelle eines Computers zu steuern. Man kann also den Videorecorder über geeignete Signale vom Computer dazu bringen, einen bestimmten Frame-Code zu finden oder den Videorecorder zu stoppen etc..

Das automatische Digitalisierungsverfahren läßt sich in folgende Blöcke unterteilen:

- a) Auffinden des Start-Frame-Codes einer genügend langen Videosequenz, die die zu digitalisierende Bildinformation enthält.
- b) Digitalisieren und Mitteln der Bilder
- c) Abspeichern des Bildes unter einer geeigneten Bezeichnung

zu a):

Die Information, ob es sich um eine interessante Videosequenz handelt, steckt in der Helligkeit des Videobildes, da zwischen den Aufnahmen die Kamera dunkelgeschaltet wurde und demnach keine Helligkeitsinformation aufgezeichnet wurde. Um diese zwei Zustände zu unterscheiden, wurde das Videoband abgespielt und nach einer Anlaufzeit von drei Sekunden, die notwendig war, damit sich das Bildsignal stabilisiert, wurde das aktuelle Bild eingefroren und damit digitalisiert. Die Grauwerte der Zeile 256 (mittlere Zeile) wurden von der Spalte 3 bis zur Spalte 492 addiert (490 Werte) und es wurde getestet ob die Summe den empirisch ermittelten Wert 31000 übersteigt. Dieses Verfahren wurde bis zur letzten Videosequenz eines
Versuchs wiederholt. Falls der oben genannte Test dreimal hintereinander (bei einem Abstend von ca. 10 Einzelbildern) positiv ausfiel, handelte es sich um eine interessante und genügend lange Videosequenz. Der Frame-Code des ersten der drei positiven Tests wurde gespeichert. Dabei mußte berücksichtigt werden, daß aufgrund der Programmlaufzeit das Einfrieren des Bildes zeitlich vor dem Lesen des Frame-Codes stattfindet. Daher mußte von dem Frame-Code ein Offsetwert von fünf abgezogen werden. Außerdem wurde in einem Flag⁽¹⁾ gespeichert (Flag wird gesetzt), daß sich das Videoband innerhalb einer interessanten Videosequenz befindet. Dies war wichtig, damit über dieses Verfahren immer ein Übergang von uninteressant zu interessant (Übergang: Flag nicht gesetzt auf Flag gesetzt) registriert wird und eine schon bearbeitete Videosequenz nicht ein zweites Mal bearbeitet wird (Übergang: Flag gesetzt auf Flag gesetzt). Durch den dreimaligen Test wurde sichergestellt, daß kein zu kurzes Bildsignal oder zufällige Störungen als vermeintlich neue interessante Bildsequenzen registriert werden. Falls ein Test negativ ausfiel, wurde der oben genannte Flag gelöscht.

Eine Eigenheit der verwendeten Bildkarte war, daß beim <u>Abspielen</u> des Videobandes die Spalten 0 bis 15 des Monitors nicht vom angezeigten Videobild beeinflußt werden. Das Videobild begann erst bei Spalte 16 und endete bei Spalte 527 (einschließlich). Das hieß aber, daß die hinteren 16 Bildspalten gar nicht zu sehen waren, da der Monitor nur 512 Spalten hat (0-511). Ferner zeigte sich, daß die Spalten 0 sowie 504 bis 511 des Videobildes keine Bildinformation enthielten (entspricht den Spalten 16 bzw. (fiktiv, da nicht zu sehen) 520 bis 527 des Monitors). Das interessante Bild befand sich also am Monitor auf den Spalten 17 bis (fiktiv) 519. Im Programm wurden daher für die oben genannten Spaltenangaben 3 und 492 die Spalten 20 bzw. 509 (einschließlich) verwendet. Im weiteren Programmverlauf wurde dieser Spaltenoffset von 17 schon beim Einfrieren der Bilder berücksichtigt.

zu b):

Das Band wurde nun auf die gespeicherte Frame-Code-Position gespult. Von dort ausgehend wurden zwei Bilder in der oberen Hälfte des Bildspeichers (die oberen 512 Zeilen * 1024 Spalten) gespeichert, die genau 5 Frame-Codes voneinander entfernt waren. Dies wurde durch eine empirisch ermittelte Verzögerungszeit erreicht, die zwischen dem Einfrieren der zwei Bilder lag. Um jedoch ausgehend von dem gespeicherten Frame-Code zwei Bilder einfrieren zu können, mußte das Band

 ⁽¹⁾ Als Flag bezeichnet man einen binären Speicher, der die Zustände '1' (=gesetzt) und '0' (=gelöscht / nicht gesetzt) annehmen kann. Flags werden somit als Marker verwendet, um bestimmte Programmzustände zu erkennen. Sie benötigen wenig Speicherplatz (1 Bit).

eine definierte Zeit zurückgespult werden, da zu Beginn des Abspielens des Bandes Verzerrungen im Bildbereich auftraten. Das Band mußte also eine bestimmte Zeit gelaufen sein, bevor Bilder eingefroren werden konnten. Da für jedes erneute Einfrieren zweier Bilder der Vorgang des Zurückspulens und des Abspielens identisch war, waren die eingefrorenen Bilder nur abhängig von der Frame-Code-Position zu Beginn des Vorgangs.

Wenn der Vorgang fünfmal wiederholt wurde und man jedesmal die Frame-Code-Startposition um eins erhöhte, konnte man so zehn Bilder einfrieren, die sich nahtlos aneinanderreihten. Bei einer Mittelung von vier Bildern (Abbildung 5.1.), wurde der Frame-Code um drei, statt um eins erhöht, damit die vier Bilder ungefähr denselben zeitlichen Abstand voneinander besaßen.

Nach jedem Vorgang waren nun zwei Bilder der Größe 512 Zeilen * 512 Spalten in der oberen Hälfte des Bildspeichers (512 Zeilen * 1024 Spalten) abgelegt. Die untere Hälfte des Bildspeichers (512 Zeilen * 1024 Spalten) wurde zum Addieren und Zwischenspeichern der eingefrorenen Bilder verwendet. Zur Speicherung der Summe zweier Pixel wurde mehr als ein Speicherplatz (=Pixel) benötigt, da jeder Speicherplatz nur die Werte zwischen 0 und 255 annehmen konnte. Daher wurde die Summe auf zwei nebeneinanderliegenden Pixel gespeichert. Die höherwertigen acht Bits der Summe wurden im linken und die niederwertigen acht Bits im rechten der zwei Pixel abgelegt. So konnten bis zu 256 Bilder innerhalb des Bildspeichers addiert werden.

Das laut Formel 5.1. gemittelte Bild wurde im linken oberen Viertel des Bildspeichers abgelegt. Noch lag das Bild dabei im Format 512 Zeilen * 512 Spalten vor. Die untere Hälfte des Bildspeichers wurde gelöscht.

zu c):

In MS-DOS bestehen die Dateinamen aus maximal acht Zeichen plus einer Ergänzung aus drei Zeichen.

Für die digitalisierten Bilder wurde die Ergänzung 'PIC' gewählt. Aufgrund der Ergänzung läßt sich feststellen, welcher Zustand innerhalb der folgenden Bildverarbeitung abgespeichert wurde. So bedeutet z. B. die Ergänzung 'SUB', daß es sich um Subtraktionsbilder handelt. 'PIC' zeigt gemittelte, aber ansonsten unbearbeitete Bilder an.

Die ersten sechs Stellen des eigentlichen Namens enthalten das Versuchsdatum in der Form 'ttmmjj' (jeweils zwei Stellen für den Tag (tt), den Monat (mm) und das Jahr (jj)). Die restlichen zwei Stellen für den Namen wurden aus einer Datei entnommen, in der anhand dieser Bezeichnungen protokolliert war, welche Bilder sich der Reihe nach auf dem Videoband befanden. So konnten auch fehlerhafte und unbrauchbare Videosequenzen anhand der Bezeichnung identifiziert werden. Die siebte Stelle im Namen gibt den Beobachtungszustand (entspricht dem Beobachtungszeitpunkt) an (z.B. '0' für Referenzbilder), die achte und letzte Stelle die Beobachtungsposition (entspricht dem Beobachtungsfeld). Bilder mit identischer achten Stelle bilden eine Bildfolge, die mit dem nachfolgenden Bildverarbeitungsverfahren behandelt werden können (nur die 40-fachen Vergrößerungen). Die Zeichen 1,3,5,7,9,B,D, etc. an der achten Stelle bezeichnen 40-fache Vergrößerungen, die Zeichen 2,4,6,8,A,C,E, etc. die dazugehörigen 76-fachen Vergrößerungen.

Nachdem der Name ermittelt wurde, wurde das Bild unter diesem Namen auf der Festplatte gespeichert. Erst dabei wurde die Spaltenzahl auf 503 begrenzt.

6. Shadingkorrekturverfahren

6.1. Allgemeines

Die digitalisierten Bilder besitzen in sich eine zum Teil stark unterschiedliche Helligkeitsverteilung, die durch die inhomogene Ausleuchtung des aufgenommenen Areals hervorgerufen wird. Diese Helligkeitsverteilung ist derart, daß in der Mitte der Bilder ein meist deutliches Helligkeitsmaximum auftritt, während die Helligkeit zum Rand hin abnimmt. Trotz optimaler Justierung der Lampe ist es mit diesen nicht möglich, die Helligkeitsverteilung im gesamten Bildbereich zu homogenisieren. Eine Homogenisierung ist jedoch nötig, da zur Berechnung der Subtraktionsbilder die zu subtrahierenden Bilder zueinander verschoben werden müssen (Lagekorrektur). Dabei muß aber in jedem Bildareal eine vergleichbare Helligkeitsdifferenz herrschen, damit das Subtraktionsbild in jedem dieser Areale gleich aussagekräftig wird.

Die Nachbearbeitung der digitalisierten Bilder, die eine Helligkeitshomogenisierung zur Folge hat, nennt man **Shadingkorrektur**. Dazu wird ein **Korrekturbild** zu Hilfe genommen, mit dem das digitalisierte Bild nach folgender Formel 6.1. korrigiert wird:

$$I_{sha}(x,y) = I(x,y) * \frac{I_{kor(max)}}{I_{kor}(x,y)};$$
 für alle Bildpunkte (x,y)

I_{sha}(x,y) = Intensität des shadingkorrigierten Bildpunktes (x,y);
I(x,y) = Intensität des zu korrigierenden Bildpunktes (x,y);
I_{kor(max)} = Maximale Intensität des Korrekturbildes;
I_{kor}(x,y) = Intensität des Korrekturbildes beim Bildpunkt (x,y);

Formel 6.1.: Shadingkorrektur

Das benötigte Korrekturbild kann man auf verschiedene Arten erhalten. Dabei kann man grob zwei Arten der Korrekturbilgewinnung unterscheiden:

- die Verwendung eines **'in vitro'-Bildes** als Grundlage für ein Korrekturbild (siehe Kapitel 6.2.)
- die Ermittlung eines synthetischen Korrekturbildes aus den zu korrigierenden Bildern selbst (siehe Kapitel 6.3.)

Falls keine Shadingkorrektur vorgenommen wird gilt: $I_{sha}(x,y) = I(x,y)$; für alle Bildpunkte (x,y).

6.2. Shadingkorrekturverfahren in vitro

Als 'in vitro'-Bild wurde die zehnfach gemittelte Aufnahme eines mit Tracerlösung gefüllten Eppendorfgefäßes in 40-facher Vergrößerung benutzt. Vor jedem Aufnahmezeitpunkt wurde dieses Gefäß aufgenommen, so daß zu jedem Aufnahmezeitpunkt ein vitro'-Bild Verfügung stand. 'in zur Der Tracer (Na+-Fluoreszein oder FITC-Dextran, je nach Versuch) wurde dabei alle 15 Minuten in gleicher Menge erneuert. Zur Rauschminderung wurde das gemittelte 'in vitro'-Bild mit einem 3*3-Kernel mediangefiltert. (Zur Medianfilterung und zum Begriff 'Kernel' siehe Anhang Kapitel A1..)

Es wurde versucht, mit dem 'in vitro'-Bild das Helligkeitsprofil der Ausleuchtung aufzunehmen, um dieses zur Shadingkorrektur heranzuziehen. Damit ist die Annahme verbunden, daß das Helligkeitsprofil dem der aufgenommenen Hirnareale identisch ist.

Dadurch, daß das 'in vitro'-Bild ein eigenständig aufgenommenes Bild darstellt, unterliegt es auch den Problemen, die bei der Aufnahme eines Bildes entstehen. So sind Artefakte im 'in vitro'-Bild, die bei der Aufnahme nicht gänzlich beseitigt werden konnten. Hierzu zählen zum Beispiel Luftblasen oder Verunreinigungen im Eppendorfgefäß. Diese sind als dunkle Objekte im Korrekturbild zu erkennen. Durch den Einfluß des Korrekturbildes im Nenner der Formel 6.1. werden diese Objekte als helle Stellen im korrigierten Bild sichtbar und täuschen eine Aufhellung des zu untersuchenden Areals an diesen Stellen vor.

6.2.1. Unverändertes 'in vitro'-Bild

Die einfachste Form der Shadingkorrektur besteht darin, als Korrekturbild das unveränderte 'in vitro'-Bild zu verwenden, wie es folgende Formel 6.2. beschreibt:

$I_{kor}(x,y) = I_{inv}(x,y);$ für alle Bildpunkte (x,y)

und damit

$I_{kor(max)} = I_{inv(max)};$

I_{kor}(x,y) = Intensität des Korrekturbildes beim Bildpunkt (x,y); I_{inv}(x,y) = Intensität des 'in vitro'-Bildes beim Bildpunkt (x,y); I_{kor(max)} = Maximale Intensität des Korrekturbildes; I_{inv(max)} = Maximale Intensität des 'in vitro'-Bildes;

Formel 6.2.: Korrekturbild = 'in vitro'-Bild

Somit muß nur der maximale Grauwert des 'in vitro'-Bildes vorher ermittelt werden und das korrigierte Bild kann dann mit Formel 6.1. berechnet werden.

Dieses Verfahren wurde anfänglich zur Shadingkorrektur verwendet (Bultmann et al. [14], Findling et al. [34,35] und Schilling et al. [78]). Es zeigte sich jedoch in manchen Versuchen, daß das 'in vitro'-Bild einen ausgeprägteren Helligkeitsverlauf aufwies, als das zu korrigierende Bild, so daß im korrigierten Bild deutliche Aufhellungen im Randbereich zu erkennen waren.

6.2.2. Angepaßtes 'in vitro'-Bild

Um die oben beschriebenen artefiziellen Aufhellungen im Randbereich zu vermeiden, wurde versucht, den Helligkeitsverlauf der 'in vitro'-Bilder dem der zu korrigierenden Bilder anzupassen. Das Ziel war es **einen** Verstärkungsfaktor **v** zu finden, der den Helligkeitsverlauf des 'in vitro'-Bildes abschwächt oder verstärkt, abhängig vom zu korrigierenden Bild.

Zunächst wurden das Maximum und sein Ort im 'in vitro'-Bild ermittelt. Trat das Maximum mehr als einmal auf, wurden die x- bzw. y-Koordinaten der verschiedenen Orte gemittelt, so daß man wiederum nur einen Ort erhielt. Danach wurden neun quadratische Regionen definiert, von denen eine als Mittelpunkt den oben ermittelten Ort besitzt. (Quadratisch ist hier auf die Anzahl der Pixel bezogen.) Vier der neun Regionen sind in den Ecken der Bilder und die restlichen vier Regionen am Rand in der Mitte der vier Seiten der Bilder. Diese acht umliegenden Regionen werden im folgenden auch Randregionen genannt. Daraus ergaben sich zwei Parameter von denen die Wirkung der Korrektur abhängt. Zum einen die Seitenlänge der Quadrate, die von dem Parameter w_A abhängt (Seitenlänge= 2^*w_A+1 ; ungeradzahlig, damit man einen Bezugspunkt (Mittelpunkt) angeben kann), und zum anderen den

Abstand d_A , den die äußeren acht Regionen vom Rand einhalten. In Abbildung 6.1. wird die Lage der Regionen verdeutlicht.



d_A: Abstand der Regionen vom Bildrand (in Pixel)



In diesen so definierten Regionen wurden nun im 'in vitro'-Bild wie auch im zu korrigierenden Bild die Mittelwerte der Grauwerte bestimmt, so daß man zu jedem der neun Bezugspunkte der Regionen je einen mittleren Grauwert erhielt. Diese Mittelung ist zum einen nötig, um den Einfluß des Rauschens zu verringern. Zum anderen wird damit nicht ein zufälliger Grauwert gemessen, der etwa in einem Gefäß

oder einem Artefakt liegt, sondern ein größerer Bildbereich gemittelt, in dem dann überwiegend die Hintergrundintensität bildbestimmend ist.

Ein Verstärkungsfaktor $\mathbf{v_i}$ (i=1,...,8) wurde nun so für jeden der acht mittleren Grauwerte am Rand definiert, daß der Intensitätsabfall im 'in vitro'-Bild bezogen auf dessen mittleren Grauwert am oben ermittelten Ort der maximalen Intensität multipliziert mit dem Verstärkungsfaktor $\mathbf{v_i}$ (i=1,...,8) gleich dem entsprechenden Intensitätsabfall im zu korrigierenden Bild bezogen auf dessen mittleren Grauwert am entsprechenden Ort ist, d.h. es muß für alle acht Randregionen laut Formel 6.3. gelten:

$$\frac{T_{max}-T_i}{T_{max}} * v_i = \frac{B_{max}-B_i}{B_{max}};$$

d.h.

 $v_i = \frac{(B_{max}-B_i)^*T_{max}}{(T_{max}-T_i)^*B_{max}}; \quad \text{für i=1,...,8}$

oder auch

 $v_i = \frac{1 - B_i / B_{max}}{1 - T_i / T_{max}};$ für i=1,...,8

 $T_{max} = \text{mittlerer Grauwert des 'in vitro'-Bildes am Ort des Maximums;}$ $B_{max} = \text{mittlerer Grauwert des zu korrigierenden Bildes am Ort des Maximums;}$ $T_i = \text{mittlerer Grauwert des 'in vitro'-Bildes bei der Randregion i (i=1,...,8);}$ $B_i = \text{mittlerer Grauwert des zu korrigierenden Bildes bei der Randregion i (i=1,...,8);}$ $v_i = \text{Verstärkungsfaktor für die Randregion i (i=1,...,8);}$

Formel 6.3.: Ermittlung der Verstärkungsfaktoren v_i (i=1,...,8)

Den resultierenden Verstärkungsfaktor **v** erhält man als Mittelwert aus den eben berechneten acht Verstärkungsfaktoren v_i laut Formel 6.4.:

$$v = \frac{\frac{8}{\sum}v_i}{8};$$

v_i = Verstärkungsfaktor für die Randregion i (i=1,...,8);
v = resultierender Verstärkungsfaktor;

Formel 6.4.: Resultierender Verstärkungsfaktor v

Besitzt der so ermittelte Verstärkungsfaktor **v** einen Wert zwischen Null und eins, so bedeutet dies eine Abschwächung des Einflusses des 'in vitro'-Bildes. Ein Wert größer eins bedeutet dagegen eine Verstärkung des Einflusses des 'in vitro'-Bildes. Ist **v=0**, so wird nicht shadingkorrigiert. Ist **v=1**, so wird das 'in vitro'-Bild unverändert als Korrekturbild verwendet (siehe Kapitel 6.2.1.).

Das Korrekturbild erhält man durch Auflösung von Formel 6.5.. Dabei wird als Bezugswert $I_{kor(max)} = I_{inv(max)}$ gesetzt, da dies einen Freiheitsgrad darstellt, der mit einem sinnvollen Wert vorbelegt werden mußte.

$$\frac{I_{kor(max)} - I_{kor}(x,y)}{I_{kor(max)}} = \frac{I_{inv(max)} - I_{inv}(x,y)}{I_{inv(max)}} * v;$$

mit Ikor(max) = Iinv(max) gilt:

 $I_{inv(max)} - I_{kor}(x,y) = (I_{inv(max)} - I_{inv}(x,y)) * v;$

und damit

$I_{kor}(x,y) = I_{inv(max)} - (I_{inv(max)} - I_{inv}(x,y)) * v;$ für alle Bildpunkte (x,y)

I_{kor(max)} = Maximale Intensität des Korrekturbildes;
I_{inv(max)} = Maximale Intensität des 'in vitro'-Bildes;
I_{kor}(x,y) = Intensität des Korrekturbildes beim Bildpunkt (x,y);
I_{inv}(x,y) = Intensität des 'in vitro'-Bildes beim Bildpunkt (x,y);
v = Verstärkungsfaktor;

Formel 6.5.: Berechnung des Korrekturbildes durch Anpassung des 'in vitro'-Bildes

Die Shadingkorrektur erfolgt dann mit Formel 6.1..

Wie oben bereits erwähnt ist die Effektivität dieser Korrekturmethode von zwei Parametern w_A und d_A abhängig, deren Werte bei der Optimierung der Methode noch ermittelt werden.

6.3. Synthetische Shadingkorrekturverfahren

Bei den folgenden beschriebenen Korrekturverfahren wird kein zusätzlich aufgenommenes Bild, wie es die 'in vitro'-Bilder darstellen, benötigt. Die Ermittlung des Helligkeitsprofils geschieht aus den zu korrigierenden Bildern selber, wobei sich keine zusätzlichen Artefakte aus zusätzlichen Aufnahmen einschleichen können. Allerdings können Informationen im Bild, die nicht das Helligkeitsprofil darstellen (wie z.B. Gefäße, Extravasationen, Artefakte), das Ergebnis beeinflussen. Um dieses zu umgehen, wurde wie in Kapitel 6.2.2. nicht auf einzelne Pixel des Bildes zurückgegriffen, sondern auf ganze Bildbereiche, die dann gemittelt werden. Dieses Verfahren hat tiefpaßähnlichen Character, so daß kleine Strukturen in diesen Bildbereichen nicht dominieren können.

6.3.1. Zweidimensionale Funktion

Die erste Methode hat zum Ziel, eine zweidimensionale Funktion zu erstellen, die das Korrekturbild darstellt, d.h. es soll laut Formel 6.6. gelten:

$I_{kor}(x,y) = f(x,y);$ für alle Bildpunkte (x,y)

 $I_{kor}(x,y)$ = Intensität des Korrekturbildes beim Bildpunkt (x,y); f(x,y) = Funktionsterm;

Formel 6.6.: Zweidimensionale Funktion

Solch eine Shadingfunktion ist durch ein cos²-Funktion darstellbar. Da sich diese Funktion jedoch nur sehr aufwendig bestimmen läßt, kann man in guter Näherung auf folgende Funktion 6.7. zurückgreifen:

 $f(x,y) = a_0 x^2 y^2 + a_1 x^2 y + a_2 x^2 + a_3 x y^2 + a_4 x y + a_5 x + a_6 y^2 + a_7 y + a_8;$

f(x,y) = Funktionsterm; $a_0,...,a_8 = Parameter;$

Formel 6.7.: 2-D-Funktionsvorschrift

Man sieht dabei, daß bei festem x-Wert die Funktion f(x,y) in y-Richtung eine Parabel ergibt. Das Gleiche gilt entsprechend für einen festen y-Wert in x-Richtung. Somit erhält man einen parabolischen Helligkeitsverlauf in x- wie in y-Richtung. Man kann dies als Näherung für ein zu ermittelndes Korrekturbild akzeptieren. Aus dem zu korrigierenden Bild kann man nun zu einem Bildpunkt (x,y) einen Funktionswert f(x,y) ermitteln, in dem man, wie oben beschrieben, um den Punkt einen quadratischen Bereich definiert, über dem man die Grauwerte mittelt. Da sich dann neun Unbekannte $(a_0,...,a_8)$ ergeben, muß man neun solcher Stützpunkte verwenden, um somit neun Gleichungen mit neun Unbekannten lösen zu können.

Die Stützpunkte wurden in die Ecken, in die Mitten der vier Seitenränder und in die Mitte des Bildes gelegt. Somit wurde der ungleiche Helligkeitsabfall von der Mitte aus in die acht Hauptrichtungen berücksichtigt. Um die nachfolgenden Matrixgleichungen lösen zu können, mußten jedoch alle Stützpunkte unterschiedliche x- und y-Werte besitzen, da sonst die später berechnete Determinante zu Null werden konnte. Dazu wurden die Stützpunkte, deren Lage vom gewählten Abstand vom Rand und von der Größe der zu mittelnden Regionen abhängig ist, zusätzlich um jeweils einen Pixel gegeneinander verschoben, so daß zwei beliebig gewählte Stützpunkte auf keinen Fall einen gleichen x- oder y-Wert besaßen. Es mußte jedoch immer ein Abstand von einem Pixel vom Rand eingehalten werden, um den gültigen Bildbereich nicht zu verlassen.

Eine 'Variante' dieses Verfahrens ergibt sich, wenn die oben ermittelten mittleren Intensitäten nicht den eigentlichen Stützpunkten, sondern den Punkten zugeordnet werden, die in der Verlängerung der Geraden (mittlerer Stützpunkt -- eigentlicher Stützpunkt) dem Bildrand innerhalb der gemittelten Region am nächsten liegen. Der mittlere Stützpunkt bleibt dabei unverändert. Diese neu ermittelten Punkte wurden dann wie die eigentlichen Stützpunkte weiter behandelt. Diese 'Variante' hat den Vorteil weit auseinanderliegender Stützpunkte trotz der Wahl von großen zu mittelnden Regionen, so daß der Funktionsterm f(x,y) am Rand nicht eventuell unkontrolliert niedrige Werte liefern kann.

Es ergeben sich also nun in Formel 6.8. folgende neun unabhängige Gleichungen:

$$a_0x_i^2y_i^2 + a_1x_i^2y_i + a_2x_i^2 + a_3x_iy_i^2 + a_4x_iy_i + a_5x_i + a_6y_i^2 + a_7y_i + a_8 = B_i;$$

für alle i=0,...,8

 $a_0,...,a_8$ = gesuchte Parameter;

x_i,y_i = Koordinaten des Stützpunktes der Region i (i=0,...,8);

 B_i = mittlerer Grauwert des zu korrigierenden Bildes bei der Region i (i=0,...,8);

Formel 6.8.: Gleichungssystem zur Bestimmung der 2-D-Funktion

In Matrizenschreibweise erhält man:

$$\begin{pmatrix} x_0^2 y_0^2 x_0^2 y_0 x_0^2 x_0 y_0^2 x_0 y_0 x_0 y_0^2 y_0 1 \\ \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ x_8^2 y_8^2 x_8^2 y_8 x_8^2 x_8 y_8^2 x_8 y_8 x_8 y_8^2 y_8 1 \end{pmatrix} \quad \begin{pmatrix} a_0 \\ a_1 \\ a_2 \\ a_3 \\ a_4 \\ a_5 \\ a_6 \\ a_7 \\ a_8 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} B_0 \\ B_1 \\ B_2 \\ B_3 \\ B_4 \\ B_5 \\ B_6 \\ B_7 \\ B_8 \end{pmatrix};$$

oder abgekürzt

X * A = B;

 $\label{eq:a0} \begin{aligned} a_0,...,a_8 &= \text{gesuchte Parameter};\\ x_0,...,x_8,y_0,...,y_8 &= \text{Koordinaten des Stützpunktes der Region 0,...,8};\\ B_0,...,B_8 &= \text{mittlerer Grauwert des zu korrigierenden Bildes bei der Region 0,...,8}; \end{aligned}$

Formel 6.9.: Matrizengleichung

Zur Lösung der Matrizengleichung in Formel 6.9. muß die Inverse der Matrix **X** ermittelt werden (**X**⁻¹), so daß man folgende Lösungsgleichung laut Formel 6.10. angeben kann:

$A = X^{-1} * B;$

mit der inversen Matrix X⁻¹ und den Vektoren A und B;

Formel 6.10.: Lösung der Matrizengleichung

Mit dem so gefundenem Vektor **A** und den darin enthaltenen Parametern $a_0,...,a_8$ kann nun nach Formel 6.6. und Formel 6.7. jeder Wert $I_{kor}(x,y)$ berechnet werden. Daraus kann dann der Wert $I_{kor(max)}$ bestimmt werden. Die Shadingkorrektur erfolgt wiederum nach Formel 6.1..

Die Effektivität jeder der zwei Varianten dieser Korrekturmethode ist auch hier von je zwei Parametern w_{Z0} (Größe der Region) und d_{Z0} (Abstand vom Bildrand) bzw. bei der 'Variante' von w_{Z1} und d_{Z1} abhängig, deren Werte bei der Optimierung der Methoden noch ermittelt werden.

6.3.2. Spezielle Tiefpaßfilterung

Bei diesem Verfahren wurde das zu korrigierende Bild gleichmäßig in $w_T^*w_T$ Pixel große Regionen unterteilt. Da ein Bild die feste Größe 503 Spalten * 512 Zeilen besitzt, konnten sich diese Regionen geringfügig überlappen. Diese Überlappung mußte gleichmäßig auf alle Regionen verteilt werden, d.h. die Regionen mußten gleichmäßig das Bild abdecken. Von diesen Regionen wurde nun jeweils der mittlere Grauwert bestimmt, damit man aus allen diesen wiederum den kleinsten ermitteln konnte. Dieser diente als Ausgangswert für weitere Untersuchungen. Außerdem gibt er die Grundhelligkeit des zu bestimmenden Korrekturbildes an, wenn man von ihm noch als Sicherheit den Wert 'eins' subtrahiert. Die mittleren Grauwerte wurden zu einem neuen verkleinerten Bild zusammengesetzt, aus dem die folgenden Graustufenebenen berechnet wurden, von denen jede so groß wie dieses verkleinerte Bild war.

Ziel des Verfahrens war es, das Korrekturbild aus seinen einzelnen Graustufenebenen zusammenzusetzen. Bei diesen Graustufenebenen handelt es sich um binäre Bilder, d.h. Bilder, bei denen nur die Werte Null und nicht Null unterschieden werden. Jede Graustufenebene repräsentiert eine Graustufe, die größer als die Grundhelligkeit des zu ermittelnden Korrekturbildes ist, die oben schon berechnet wurde. Die Ermittlung der Graustufenebenen durchlief folgende Schritte:

Zunächst wurden alle Graustufenebenen mit dem Wert Null vorbelegt.

Jeder Punkt der Graustufenebenen korrespondiert mit der an entsprechender Stelle liegenden Region im zu korrigierenden Bild.

Man gibt jetzt eine **Eliminierungsgrenze** e_T (z.B. 10% (e_T =10)) vor, d.h. die hellsten (hier im Beispiel) 10% aller Pixel jeder einzelnen Region wurden verworfen, und aus den restlichen Pixeln wird nun ein mittlerer Grauwert für jede Region ermittelt. Diese Eliminierungsgrenze wurde deshalb eingeführt, da es möglich sein kann, daß helle Strukturen den Mittelwert als Maß für die Hintergrundhelligkeit beeinflussen können. Dazu wurde das Grauwerthistogramm jeder Region berechnet und die hellsten (hier im Beispiel) 10% der Grauwerte verworfen. Eine Eliminierungsgrenze von 0% bedeutet eine uneingeschränkte Mittelung der Grauwerte einer Region. Der ermittelte Mittelwert gibt gerundet den repräsentativen Grauwert für die entsprechende Region an.

Bei allen Graustufenebenen, die eine Helligkeit repräsentierten, die kleiner oder gleich dem ermittelten Grauwert sind, wurde der der Region entsprechende Punkt größer Null gesetzt. Gleichzeitig wurde hierbei der größte dieser Grauwerte ermittelt, um die Anzahl der Graustufenebenen bestimmen zu können.

Um diese Bilder weiterbearbeiten zu können, mußten zunächst die zwei Pixel breiten Ränder gesichert werden, da dieser Raum bei den folgenden Algorithmen als Informationsträger verlorengeht. Hierbei muß man in Kauf nehmen, daß diese Ränder nicht weiterbearbeitet werden.

Von den binären Graustufenebenen wurde nun ein ein Pixel breiter Rand gelöscht, um folgende zwei Algorithmen anwenden zu können. Dabei bedeutet 'Vierernachbarschaft' die vier Pixel, die direkt links oder rechts von dem Pixel oder direkt über oder unter dem Pixel liegen. In der Literatur (Haberäcker [44], Castelmann [18], Pratt [66]) wird auch von Kontraktion oder Expansion bzw. von Erosion oder Dilation gesprochen. Mize et al. [56] verwendeten ebenfalls diese Algorithmen.

Algorithmus 1 (Kontraktion):

Jeder Pixel ungleich Null, der in seiner Vierernachbarschaft mindestens einen Pixel gleich Null besitzt, wird zu Null gesetzt. Alle anderen Pixel bleiben unverändert.

Algorithmus 2 (Expansion):

Jeder Pixel gleich Null, der in seiner Vierernachbarschaft mindestens einen Pixel ungleich Null besitzt, wird auf einen Wert ungleich Null gesetzt. Alle anderen Pixel bleiben unverändert.

Algorithmus 1 bewirkt, daß der Rand von zusammenhängenden Bereichen ungleich Null zu Null gesetzt wird. Dagegen bewirkt Algorithmus 2, daß um den Rand von zusammenhängenden Bereichen ein neuer Rand gelegt wird. In den Abbildungen 6.2. und 6.3. werden die Wirkungsweisen der zwei Algorithmen verdeutlicht.



Abbildung 6.2.: Algorithmus 1 (Kontraktion)



Abbildung 6.3.: Algorithmus 2 (Expansion)

Zur Weiterbearbeitung wurde nun zunächst Algorithmus 1 und dann Algorithmus 2 angewendet. Dies bewirkte, daß alleinstehende Punkte oder 'dünne' Strukturen aus den Graustufenebenen gelöscht wurden. Andere Strukturen wurden nicht verändert. Danach wurden die Algorithmen in umgekehrter Reihenfolge gestartet. Dieses bewirkte eine Auffüllung von kleinen 'Löchern' oder 'Rissen' in zusammenhängenden Bereichen. Auch hier wurden andere Strukturen nicht verändert.

Durch die Anwendung der zwei Algorithmen wurde versucht, die Graustufenebenen 'rund' zu machen, also von 'Störungen' zu befreien, die von Gefäßen oder Artefakten verursacht wurden.

Danach wurden die Graustufenebenen wieder zu einem Bild zusammengesetzt. Dieses Bild war mit der oben ermittelten Grundhelligkeit vorbelegt. Die Pixel ungleich Null der gesicherten zwei Pixel breiten Ränder sowie der Graustufenebenen wurden von dunkel nach hell auf das so resultierende Bild kopiert.

Das ermittelte Bild wurde nun mit einem 3*3-Kernel, der überall mit 1/9 belegt ist, tiefpaßgefiltert, um das Bild zu harmonisieren. Hierbei wurden Nachbarschaftsverhältnisse der Regionen berücksichtigt und 'Ausreißer' 'geglättet'. Bei großen Werten von w_T entspricht dieser Schritt einer 'starken' Tiefpaßfilterung. Anschließend wurde das Bild auf die originale Bildgröße von 503 Spalten * 512 Zeilen vergrößert. Dabei wurden zeilenweise von links nach rechts jeder Punkt des Bildes auf jeden Punkt der entsprechenden anfangs definierten und zugehörigen Region kopiert.

Dieses Bild enthielt nun durch die Vergrößerung verursachte waagrechte und senkrechte Helligkeitssprünge. Diese mußten durch eine erneute Tiefpaßfilterung mit einem $w_T^*w_T$ -Kernel, der gleichmäßig belegt ist, geglättet werden. Falls w_T gerade ist wurde ein $(w_T+1)^*(w_T+1)$ -Kernel verwendet.

Die Tiefpaßfilterung und der Begriff 'Kernel' ist im Anhang Kapitel A2. näher erläutert.

Das so erhaltene Bild stellte nun das Korrekturbild dar, von dem man das Maximum Ikor(max) bestimmen mußte, um dann das zu korrigierende Bild mit diesem Korrekturbild nach Formel 6.1. korrigieren zu können.

Zur Bestimmung des Korrekturbildes mußten zwei Parameter, nämlich die Regionengröße $w_T^*w_T$ und die Eliminierungsgrenze e_T vorgegeben werden. Diese Werte werden bei der Optimierung der Methode noch ermittelt.

6.4. Gütevergleich der Shadingkorrekturverfahren

Die Shadingkorrektur soll bewirken, daß der Helligkeitsabfall zum Rand der Bilder hin ausgeglichen wird, d.h. die mittleren Helligkeiten in beliebigen Regionen eines Bildes sollen wenig streuen. Dieses gilt aber nur für Bilder ohne Extravasationen, die eine gleichmäßige Verteilung von Gefäßen und Hintergrund beinhalten. Daher wurden zur Untersuchung der Güte der Korrekturverfahren nur die **Referenzbilder** der Versuche herangezogen, bei denen noch keine Extravasationen zu finden waren. Bei diesen Referenzbildern kann man annehemen, daß Gefäße und Hintergrund gleich verteilt sind. 40 (**p=40**) Referenzbilder wurden analysiert.

Um die Güte der Shadingkorrektur zu vergleichen, wurden die korrigierten Bilder in **n*n** gleich große Regionen aufgeteilt, die das Bild gerade aber vollständig abdeckten. **n** sollte gerade sein, da man damit den **3*3**-Einteilungen bei einigen Korrekturverfahren entgegenwirkt. Außerdem sollte **n** nicht zu groß sein, um genügend große Areale zu messen, die dann auch für die Grundhelligkeit Aussagekraft besitzen. Daher wurde **n=6** gewählt. Falls bei den Vergleichen damit Probleme auftauchten, wurde als zweiter Wert **n=4** herangezogen.

Für die 36 Regionen (**n=6**) wurden die mittleren Helligkeiten $m_1,...,m_{n^*n}$ bestimmt. Für die 36 Werte wurden dann laut Formeln 6.11. und 6.12. Mittelwert **m** und Standardabweichung **s**_a je Bild bestimmt.

$$m = \frac{\sum_{i=1}^{n*n} m_i}{n*n};$$

n*n = Anzahl der Regionen; m_i = mittlere Intensität der Region i (i=1,...,n*n); m = Mittelwert der Regionen;

Formel 6.11.: Mittelwert m der Regionen

$$\mathbf{s}_{a} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n^{*}n}}{\sum_{i=1}^{n^{*}n}}};$$

n*n = Anzahl der Regionen; m_i = mittlere Intensität der Region i (i=1,...,n*n); m = Mittelwert der Regionen; s_a = absolute Standardabweichung der Regionen;

Formel 6.12.: Absolute Standardabweichung s_a der Regionen

Als typischer Wert für die Güte einer Shadingkorrektur wurde diese absolute Standardabweichung s_a in Relation zum Mittelwert **m** gesetzt, damit für dunklere Bilder für die Güte vergleichbare Werte ermittelt werden konnten wie für hellere Bilder (siehe Formel 6.13.).

$$s_r = \frac{s_a}{m};$$

 $\label{eq:main_spin} \begin{array}{l} m = \mbox{Mittelwert der Regionen;} \\ s_a = \mbox{absolute Standardabweichung der Regionen;} \\ s_r = \mbox{relative Standardabweichung der Regionen;} \end{array}$

Formel 6.13.: Relative Standardabweichung s_r der Regionen

Je kleiner die so ermittelte relative Standardabweichung s_r je Bild ist, um so höher ist die Güte der Shadingkorrektur bei diesem Bild. Die so ermittelten Referenzwerte s_a und s_r für unkorrigierte Bilder (also Bilder, die nicht shadingkorrigiert wurden) lauten $s_a(ref)$ bzw. $s_r(ref)$.

6.4.1. Optimieren der Shadingkorrekturverfahren

Einigen Korrekturverfahren sind von a priori festzulegenden Parametern abhängig. Diese Parameter müssen so bestimmt werden, daß jedes Korrekturverfahren für sich optimale Wirkung zeigt. Die relative Standardabweichung s_r , die ein Maß für die Güte darstellt, wurde dabei, wie oben beschrieben, für jedes Bild extra ermittelt. Zu jedem Bild gab es darüberhinaus einen entsprechenden Referenzwert $s_{r(ref)}$, der ohne Korrektur ermittelt wurde. Um die verschiedenen Werte der einzelnen Bilder unterscheiden zu können, wurden die Variablen s_r , $s_{r(ref)}$, s_a und $s_{a(ref)}$ nummeriert, so daß als Beispiel die Werte für Bild 5 s_{r5} , $s_{r(ref)5}$, s_{a5} bzw. $s_{a(ref)5}$ lauten.

Da nicht die einzelnen Korrekturen, sondern die Wirkung der Verfahren über viele verschiedene Bilder interessiert, wurde ein korrekturspezifischer Wert $k_{r,n}$ wie folgt ermittelt: Die Referenzwerte $s_{r(ref)1,2,...,p}$ sowie die relativen Standardabweichungen $s_{r1,2,...,p}$ für die einzelnen korrigierten Bilder wurden getrennt summiert und die Summen wurden subtrahiert. Dieser Wert wurde auf die Summe der Referenzwerte bezogen und in Prozenten angegeben, so daß man Werte kleiner gleich 100% erhält (siehe Formel 6.14.). Der Index n bezieht sich auf die Regionenanzahl n^*n , mit der die Standardabweichungen $s_{r1,2,...,p}$ und $s_{r(ref)1,2,...,p}$ ermittelt wurden.

$$k_{r,n} = \frac{\sum_{i=1}^{p} s_{r(ref)i} - \sum_{i=1}^{p} s_{ri}}{\sum_{i=1}^{p} s_{r(ref)i}} * 100\%;$$

 $\label{eq:product} \begin{array}{l} p = \text{Anzahl der bearbeiteten Bilder;} \\ s_{r(ref)i} = \text{Referenzwert (relativ) des unbearbeiteten Bildes i (i=1,...,p);} \\ s_{ri} = \text{relative Standardabweichung des bearbeiteten Bildes i (i=1,...,p);} \\ n = \text{Regionenindex;} \\ k_{r,n} = \text{korrekturspezifischer Wert (relativ);} \end{array}$

Formel 6.14.: Korrekturspezifischer Wert (relativ) kr.n

Für jede Parameterkombination erhielt man so einen Wert, der bei der optimalen Einstellung maximal sein muß. Ein Wert von $\mathbf{k_{r,n}}$ =100% bedeutet eine optimale Korrektur, ein Wert von $\mathbf{k_{r,n}}$ =0% bedeutet keine Verbesserung gegenüber den unkorrigierten Bildern und ein negativer Wert $\mathbf{k_{r,n}}$ <0% bedeutet eine Verschlechterung gegenüber den unkorrigiergten Bildern. Für die absoluten Standardabweichungen $\mathbf{s_a}$ kann entsprechend laut folgender Formel 6.15. ein korrekturspezifischer Wert $\mathbf{k_{a,n}}$ ermittelt werden:

$$k_{a,n} = \frac{\sum_{i=1}^{p} s_{a(ref)i} - \sum_{i=1}^{p} s_{ai}}{\sum_{i=1}^{p} s_{a(ref)i}} * 100\%;$$

p = Anzahl der bearbeiteten Bilder;

s_{a(ref)i} = Referenzwert (absolut) des unbearbeiteten Bildes i (i=1,...,p);

s_{ai} = absolute Standardabweichung des bearbeiteten Bildes i (i=1,...,p);

n = Regionenindex;

k_{a,n} = korrekturspezifischer Wert (absolut);

Formel 6.15.: Korrekturspezifischer Wert (absolut) ka.n

In den nachfolgenden Abbildungen kann statt der Schreibweise $k_{a,n}$ und $k_{r,n}$ auch die Schreibweise k(a,n) bzw. k(r,n) verwendet sein.

Ermittelt wurden die optimalen Parameterkombinationen iterativ, d. h. zu Beginn der Untersuchung gab man einen Parameter fest vor, bei dem man glaubte, gute Ergebnisse zu erhalten, und variierte den anderen so lange bis sich ein Maximum einstellte. Nun fixierte man den zweiten Parameter bei diesem Maximum und variierte den ersten Parameter bis sich wiederum ein Maximum einstellte. Dieses Verfahren wurde so oft wiederholt, bis sich zweimal hintereinander ein Maximum bei der gleichen Parameterkombination einstellte. Dann ist die optimale Einstellung erreicht. Dieses Verfahren ist anwendbar, da man annehmen kann, daß sich nur ein deutliches Maximum ausbilden wird, da die Parameter keinen großen Einfluß aufeinander ausüben, und damit als unabhängig anzusehen sind.

Die folgenden Abbildungen besitzen eigentlich diskrete Werte. Zur besseren Lesbarkeit sind diese diskreten Werte mit Geraden verbunden.

6.4.1.1. Angepaßtes 'in vitro'-Bild

Bei diesem Korrekturverfahren gibt es folgende zwei Parameter: die Regionengröße und deren Abstand vom Rand des Bildes. Die Regionen sind quadratisch mit einer Seitenlänge von 2^*w_A+1 Pixel, d. h. der Parameter w_A ist ein Maß für die Regionengröße. Der Parameter d_A gibt den Abstand der Regionen vom Rand des Bildes in Pixel an. In den folgenden Abbildungen 6.4. und 6.5. ist die Abhängigkeit des korrekturspezifischen Wert $k_{r,6}$ von w_A bzw. d_A angegeben, wobei der jeweils andere Parameter auf den letztendlich ermittelten Wert ($w_A=23$; $d_A=0$) fixiert ist. In den folgenden Abbildungen wird z.B. statt ' d_A ' die Schreibweise d(A) verwendet. w(A) steht somit für w_A , und k(r,6) für $k_{r,6}$.



Abbildung 6.4.: Abhängigkeit von $k_{r,6}$ vom Parameter w_A für das Shadingkorrekturverfahren mit angepaßtem 'in vitro'-Bild

w_A: Maß für die Größe der Meßregionen; d_A: Pixelabstand der Meßregionen vom Bild



Abbildung 6.5.: Abhängigkeit von $k_{r,6}$ vom Parameter d_A für das Shadingkorrekturverfahren mit angepaßtem 'in vitro'-Bild

 w_A : Maß für die Größe der Meßregionen; d_A : Pixelabstand der Meßregionen vom Bild

Aus der Abbildung 6.4. ist zu erkennen, daß $\mathbf{k}_{r,6}$ eigenlich für \mathbf{w}_{A} =21 maximal wird. Da jedoch auch bei \mathbf{w}_{A} =23 ein lokales Maximum erscheint, ist es angebracht, auch $\mathbf{k}_{r,4}$ als Hilfestellung zu untersuchen, wie in Abbildung 6.6. dargestellt.



Abbildung 6.6.: Abhängigkeit von k_{r,4} vom Parameter w_A für das Shadingkorrekturverfahren mit angepaßtem 'in vitro'-Bild

w_A: Maß für die Größe der Meßregionen; d_A: Pixelabstand der Meßregionen vom Bild

Auch hier sieht man zwei Maxima bei w_A =21 und bei w_A =23. Zur endgültigen Entscheidung sollte man noch den Verlauf von $k_{a,6}$ heranziehen, der in Abbildung 6.7. dargestellt ist:



Abbildung 6.7.: Abhängigkeit von $k_{a,6}$ vom Parameter w_A für das Shadingkorrekturverfahren mit angepaßtem 'in vitro'-Bild

w_A: Maß für die Größe der Meßregionen; d_A: Pixelabstand der Meßregionen vom Bild

Hier erkennt man ein Maximum bei w_A =24, d. h. man sollte den größeren der beiden Werte w_A =21 bzw. w_A =23 als optimalen Parameterwert verwenden. Dies kommt auch einer Mittelung über größere Regionen zugute.

Der Randparameter d_A wurde zu Null gesetzt, da für Werte größer Null ein deutlicher Abfall in Abbildung 6.5. zu erkennen ist. Dies muß so sein, da durch einen größeren Abstand der Regionen vom Rand die Empfindlichkeit des Korrekturverfahrens herabgesetzt wird.

Die optimale Parameterkombination für das Shadingkorrekturverfahren der angepaßten 'in vitro'-Bilder ergab sich so zu ($w_A=23$; $d_A=0$).

6.4.1.2. Zweidimensionale Funktion

Die Bestimmung der zweidimensionalen Funktion hängt ebenfalls von zwei Parametern, nämlich der Größe der zu mittelnden Regionen und dem Abstand dieser Regionen vom Bildrand ab. Außerdem gibt es eine Variante des Verfahrens, bei dem die mittleren Helligkeiten der gemittelten Regionen nicht dem zentralen Punkt der einzelnen Regionen zugeordnet werden, sondern einem am Rand der Regionen liegenden Punkt, wie in Kapitel 6.3.1. beschrieben wurde. Wie im vorangegangenen Kapitel sind die Regionen quadratisch mit einer Seitenlänge von $2^*w_{Z}+1$ Pixel, d. h. auch hier ist der Parameter w_Z ein Maß für die Größe der Regionen. Der Abstand der Regionen ist mit dem Parameter d_Z in Pixel festgelegt. Hier muß allerdings d_Z mindestens 1 sein, da wie in Kapitel 6.3.1. beschrieben die Regionen um einen Pixel gegeneinander verschoben sind, weil sonst die zu bestimmende Determinante bei der Matrixinversion 0 werden würde. Um den Bildbereich nicht zu verlassen, muß diese Grenze eingehalten werden.

Zunächst wird der 'Normalfall' betrachtet, bei dem den Stützwerten selbst die mittleren Intensitäten zugeordnet werden. Zur Unterscheidung des 'Normalfalles' und der 'Variante' werden die Parameter w_{Z0} und d_{Z0} (für den 'Normalfall') bzw. w_{Z1} und d_{Z1} (für die 'Variante') bezeichnet.

Die Abbildungen 6.8. und 6.9. stellen die Abhängigkeit des korrekturspezifischen Wertes $\mathbf{k}_{r,6}$ von den Parametern \mathbf{w}_{Z0} bzw. \mathbf{d}_{Z0} in der Umgebung der optimalen Parameterkombination (\mathbf{w}_{Z0} =53; \mathbf{d}_{Z0} =1) dar.



Abbildung 6.8.: Abhängigkeit von $k_{r,6}$ vom Parameter w_{Z0} für das Shadingkorrekturverfahren mit zweidimensionaler Funktion ('Normalfall')

w_{Z0}: Maß für die Größe der Meßregionen; d_{Z0}: Pixelabstand der Meßregionen vom Bild



Abbildung 6.9.: Abhängigkeit von k_{r,6} vom Parameter d_{Z0} für das Shadingkorrekturverfahren mit zweidimensionaler Funktion ('Normalfall')

 w_{Z0} : Maß für die Größe der Meßregionen; d_{Z0} : Pixelabstand der Meßregionen vom Bild

In Abbildung 6.9. erkennt man deutlich, daß der optimale Wert für d_{Z0} bei 1 liegt. Dagegen sieht man in Abbildung 6.8. zwei Maxima bei w_{Z0} =53 und bei w_{Z0} =55. Daß der kleinere Wert für w_{Z0} geeigneter ist zeigt Abbildung 6.10., in der die Abhängigkeit von $k_{a,6}$ vom Parameter w_{Z0} dargestellt ist.



Abbildung 6.10.: Abhängigkeit von k_{a,6} vom Parameter w_{Z0} für das Shadingkorrekturverfahren mit zweidimensionaler Funktion ('Normalfall')

w70: Maß für die Größe der Meßregionen; d70: Pixelabstand der Meßregionen vom Bild

Hier erkennt man das Maximum bei w_{Z0} =51. Da aber $k_{r,6}$ Priorität hat, wird als optimale Parameterkombination w_{Z0} =53 und d_{Z0} =1 gewählt.

Die folgenden Abbildungen 6.11. und 6.12. zeigen die entsprechenden Abhängigkeiten von $\mathbf{k_{r,6}}$ für die oben erwähnte 'Variante' des Korrekturverfahrens in deren Umgebung der optimalen Parameterkombination ($\mathbf{w_{Z1}=26;d_{Z1}=40}$). Die Maxima sind deutlich bei $\mathbf{w_{Z1}=26}$ (Abbildung 6.11.) und bei $\mathbf{d_{Z1}=40}$ (Abbildung 6.12.) zu erkennen.



Abbildung 6.11.: Abhängigkeit von k_{r,6} vom Parameter w_{Z1} für das Shadingkorrekturverfahren mit zweidimensionaler Funktion ('Variante')

 w_{Z1} : Maß für die Größe der Meßregionen; d_{Z1} : Pixelabstand der Meßregionen vom Bild



Abbildung 6.12.: Abhängigkeit von k_{r,6} vom Parameter d_{Z1} für das Shadingkorrekturverfahren mit zweidimensionaler Funktion ('Variante')

w_{Z1}: Maß für die Größe der Meßregionen; d_{Z1}: Pixelabstand der Meßregionen vom Bild

Man kann jetzt schon an den Maximalwerten für $\mathbf{k}_{r,6}$ erkennen, daß die 'Variante' dieses Verfahrens keine Verbesserung gegenüber dem Normalfall bewirkt. Dieses Verhalten wird später noch untersucht.

6.4.1.3. Spezielle Tiefpaßfilterung

Dieses Verfahren hängt, wie in Kapitel 6.3.2. beschrieben, von der Regionengröße w_T und dem Eliminierungsgrad e_T (oben im Beispiel 10(%)) ab. Dabei gibt $w_T^*w_T$ die Anzahl der Pixel einer Region an. Somit ist w_T die Seitenlänge der Regionen in Pixel gemessen. Da bei diesem Verfahren jeder Region ein Grauwert zugeordnet wird, der den Hintergrund repräsentieren soll, sollte der Hintergrund auch in jeder Region präsent sein, d. h. aber für den Parameter $\mathbf{w}_{\mathbf{T}}$, daß er größenordnungsmäßig mindestens so groß sein sollte, wie die größten vorkommenden Gefäße. Die Durchmessermessungen der größten Gefäße in dem untersuchten Versuchszeitraum ergibt einen Mittelwert von 13,578 und eine Standardabweichung von 6,606 (jeweils in Pixelanzahl). Als untere Grenze für den Durchmesser kann man nun den Mittelwert plus die Standardabweichung (als Sicherheit) nehmen (=20,184), so daß man als untere Grenze für wr den Wert 20 heranziehen kann. Höhere Werte sind jedoch vorzuziehen. Eine strenge 'worst case'-Bestimmung ist wegen der glättenden Wirkung der Tiefpaßfilterungen nicht notwendig und würde wegen des hohen Wertes für w_T sehr lange Rechenzeiten bei der zweiten Tiefpaßfilterung in Anspruch nehmen. (Zur Tiefpaßfilterung siehe Anhang Kapitel A2..)

Mit dieser Vorbedingung ($w_T \ge 20$) konnten nun die Abbildungen 6.13. und 6.14. ermittelt werden. In Abbildung 6.13. ist bei w_T =25 ein lokales Maximum zu erkennen. Es liegt daher nahe, diesen Wert als optimalen anzusehen, da zu kleineren Werten hin zunächst eine Verschlechterung zu erkennen ist, und danach der Einfluß kleinerer Strukturen konsequent zunimmt. In Abbildung 6.14. sieht man, daß die besten Ergebnisse durch eine Mittelung über die unbeschränkten Regionen erzielt werden, d.h. der Parameter e_T muß zu Null gesetzt werden. Zu beachten ist dabei die nicht lineare x-Achsen-Einteilung. Dieses Ergebnis ermöglicht auch eine Rechenzeitverkürzung, da keine Histogramme über die Regionen ermittelt werden müssen. Die optimale Parameterkombination ist für dieses Verfahren so zu (w_T =25; e_T =0(%)) ermittelt.



Abbildung 6.13.: Abhängigkeit von $k_{r,6}$ vom Parameter w_T für das Shadingkorrekturverfahren mit spezieller Tiefpaßfilterung

w_T: Seitenlänge der Meßregionen in Pixel; e_T: Eliminierungsgrenze



Abbildung 6.14.: Abhängigkeit von $k_{r,6}$ vom Parameter e_T für das Shadingkorrekturverfahren mit spezieller Tiefpaßfilterung

w_T: Seitenlänge der Meßregionen in Pixel; e_T: Eliminierungsgrenze

6.4.2. Vergleich der Shadingkorrekturverfahren

In Kapitel 6.4.1. wurden mit Hilfe des korrekturspezifischen Wertes $\mathbf{k_{r,6}}$ die optimalen Parameterkombinationen ermittelt, so daß jedes Shadingkorrekturverfahren optimiert wurde. Aus diesen Verfahren ist jetzt das beste auszuwählen, mit dem die Bilder für die nachfolgenden Untersuchungen bearbeitet werden sollten, um optimale Vorraussetzungen für die nachgeschalteten Bildverarbeitungsschritte zu schaffen. Ein Vergleich der optimierten Verfahren untereinander ist nun ebenfalls mit dem korrekturspezifischen Wert $\mathbf{k_{r,6}}$ nach der Definition in Kapitel 6.4.1. möglich, wie es in Abbildung 6.15. dargestellt ist.



Abbildung 6.15.: Korrekturspezifischer Wert k_{r,6} in Abhängigkeit von den optimierten Shadingkorrekturverfahren

Aus der Abbildung 6.15. geht eindeutig das Verfahren der speziellen Tiefpaßfilterung als bestes Shadingkorrekturverfahren hervor. ist neben Dort dem korrekturspezifischen Wert der einen Mittelwert darstellt, k_{r.6}, auch die entsprechende Standardabweichung s_k der p=40 untersuchten Bilder nach oben wie nach unten - vom Mittelwert kr.6 ausgehend - aufgetragen. Die relative Standardabweichung sk ist auf die unkorrigierten Bilder bezogen und wird mit folgender Formel 6.16. ermittelt (siehe auch Formel 6.14.):



p = Anzahl der Bilder;

 s_{ri} = relative Standardabweichung des bearbeiteten Bildes i (i=1,...,p);

s_{r(ref)i} = Referenzwert des unbearbeiteten Bildes i (i=1,...,p);

s_{r(ref)m} = mittlerer Referenzwert;

s_{r(abw)} = mittlere Abweichung vom mittleren Referenzwert;

 s_k = relative Standardabweichung über die einzelnen bearbeiteten Bilder;

Formel 6.16.: Standardabweichung über die einzelnen Bilder

Man kann deutlich erkennen daß das Verfahren der speziellen Tiefpaßfilterung die zuverlässigsten und vergleichbarsten Werte liefert, da bei diesem Verfahren der korrekturspezifische Wert $\mathbf{k_{r,6}}$ mit 88,48 % am größten und die Standardabweichung $\mathbf{s_k}$ am kleinsten ist. Dieses Verfahren wurde daher in Findling et al. [35] publiziert. Das Shadingkorrekturverfahren mit angepaßten 'in vitro'-Bildern (verwendet in Bultmann et al. [14] und Findling et al. [34]) besitzt dagegen einen korrekturspezifischen Wert $\mathbf{k_{r,6}}$ von 26,38 %, das Verfahren mit unveränderten 'in vitro'-Bildern (verwendet in Findling [33] und Schilling et al. [78]) sogar nur einen Wert $\mathbf{k_{r,6}}$ von 3,03 %.

In Abbildung 6.16. ist nun für alle 40 (**p=40**) untersuchten Referenzbilder die relative Standardabweichung **s**_r der Mittelwerte der Regionen (**n=6**) für die optimierten Shadingkorrekturverfahren dargestellt. Auch hier sieht man, daß das Shadingkorrekturverfahren der speziellen Tiefpaßfilterung für jedes Bild das beste Ergebnis liefert und daß das Verfahren für unterschiedliche Ausgangssituationen Werte für **s**_r liefert, die wenig streuen. Zur besseren Ablesbarkeit der Ergebnisse, sind die diskreten Werte entsprechender Korrekturverfahren in der Abbildung 6.16. mit Geraden verbunden.



Abbildung 6.16.: Relative Standardabweichung s_r der untersuchten Referenzbilder für die optimierten Shadingkorrekturverfahren

Hier erkennt man, daß die 'Variante' des Verfahrens der zweidimensionalen Funktion in der Regel schlechter ist, als der 'Normalfall' dieses Verfahrens. Man sieht auch, daß manchmal das Verfahren mit einem unbearbeiteten 'in vitro'-Bild das Ergebnis sogar verschlechtern kann gegenüber der unkorrigierten Bilder. Das bestätigt die Erfahrung aus früheren Versuchen, für die es manchmal besser war, keine Shadingkorrektur in dieser Form vorzunehemen. Diese Verschlechterungen lassen sich durch die angepaßten 'in vitro'-Bilder umgehen, jedoch sind die synthetischen Verfahren und allen voran das Verfahren der speziellen Tiefpaßfilterung den 'in vitro'bildgestützten Verfahren deutlich überlegen.

6.5. Möglichkeiten der Anwendung

Das so gefundene Ergebnis wurde mit Referenzbildern ermittelt, die keine Extravasationen enthielten. So stellt sich nun die Frage, wie diese Methode bei einer kompletten Auswertung verschiedenster zu untersuchender Bilder angewandt Bei der Ermittlung des Extravasationswertes muß das zu werden kann. untersuchende Testbild. wie auch subtrahierende das zu Referenzbild shadingkorrigiert werden. Für das Referenzbild ist die oben beschriebene Methode passend, da sie ja an Referenzbildern ermittelt wurde. Für die Shadingkorrektur des zu untersuchenden Testbildes gibt es nun zwei Möglichkeiten:

- Das zu untersuchende Testbild wird mit dem Korrekturbild des Referenzbildes shadingkorrigiert. Die Shadingkorrektur der Testbilder erfolgt hier mit dem mit Hilfe des Referenzbildes ermittelten Korrekturbild. Dabei wird die Shadingkorrektur auf die gleiche Art nach Formel 6.1. berechnet, wie beim Referenzbild.
- Für das zu untersuchende Testbild wird ein eigenes Korrekturbild ermittelt. Hierbei wird auf die oben beschriebene Art ein Korrekturbild aus dem zu untersuchenden Testbild ermittelt, mit dem das zu untersuchende Testbild nach Formel 6.1. shadingkorrigiert wird.

Welche der zwei Methoden ein besseres Ergebnis liefert, wird, wie auch die Güte der in den nachfolgenden Kapiteln beschriebenen Verfahren, in Kapitel 12. untersucht und beschrieben.

7. Helligkeitsangleich

7.1. Allgemeines

Bedingt durch die Aufnahmetechnik und Schwankungen der Tracerintensität im Blutplasma kann die Bildhelligkeit in einer Bildreihe sehr schwanken. Dieses führt zu einer Verfälschung des interessierenden Ergebnisses. So wurde zum Teil beobachtet, daß das Referenzbild in der mittleren Helligkeit heller war als die folgenden Bilder, bei denen ebenfalls eine zeitliche Abnahme der Helligkeit zu erkennen war. Um dieses Phänomen, das zwangsläufig eine falsche Verminderung des Ef-Wertes nach sich zieht, zu kompensieren, muß ein Helligkeitsangleich der Bilder erfolgen. Dieser Helligkeitsangleich kann zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, und auf verschiedene Arten stattfinden. Zum einen können die Bilder nach der Shadingkorrektur und vor der Lagekorrektur entweder multiplikativ, oder additiv dem Niveau des Referenzbildes angepaßt werden, zum anderen können die Bilder über ihre Grauwerthistogramme als Subtraktionsbildnachbearbeitung aneinander angepaßt werden. Da diese zweite Methode eine Subtraktionsbildnachbearbeitung darstellt, wird sie erst in Kapitel 10.2. behandelt.

Falls kein Helligkeitsangleich vorgenommen wird gilt: $I_{hell}(x,y) = I_{sha}(x,y)$; für alle Bildpunkte (x,y).

7.2. Helligkeitsangleich vor der Subtraktion

Wie oben schon angesprochen gibt es hier zwei Möglichkeiten die Bilder an das Niveau der Referenzbilder anzugleichen: additiv oder multiplikativ. Das hier Angesprochene Niveau bedeutet nicht die mittlere Helligkeit des gesamten Bildes, sondern im Idealfall die mittlere Helligkeit der gefäßfreien Regionen, ohne Artefakte und natürlich ohne Extravasationen. Um dieses Niveau der Bilder annähernd zu ermitteln, wurde jedes Bild in 5*5=25 Regionen eingeteilt und die mittleren Helligkeiten dieser Regionen wurden ermittelt. Die dunkelste Region repräsentiert das Niveau des Bildes, das mit der Helligkeit der lageidentischen Region des Referenzbildes verrechnet wird.

7.2.1. Additiver Helligkeitsangleich

Beim additiven Helligkeitsangleich wurde zu jedem Pixel des zu untersuchenden Testbildes laut Formel 7.2. ein Korrekturwert K_a addiert. Dieser Korrekturwert K_a ergab sich aus der Differenz der Mittelwerte der dunkelsten Region des zu

untersuchenden Bildes und der lageentsprechenden Region des Referenzbildes (siehe Formel 7.1.). Dieser Korrekturwert K_a wurde auf eine ganze Zahl gerundet.

$$K_a = M_{Ref,i} - M_{i;}$$

 $M_{\text{Ref},i}$ = mittlere Intensität der Region i des Referenzbildes; M_i = mittlere Intensität der dunkelsten Region i des zu korrigierenden Bildes; K_a = additiver Korrekturwert; i = Regionenindex (0...24);

Formel 7.1.: Ermittlung eines additiven Korrekturwertes Ka

$$I_{hell}(x,y) = \begin{cases} 0 \text{falls } I_{sha}(x,y) + K_a < 0 \\ 255 \text{falls } I_{sha}(x,y) + K_a > 255 \\ I_{sha}(x,y) + K_a \text{sonst} \end{cases}$$

für alle Bildpunkte (x,y)

 $I_{sha}(x,y) =$ Intensität des shadingkorrigierten Bildes beim Bildpunkt (x,y); $I_{hell}(x,y) =$ Intensität des helligkeitskorrigierten Bildes beim Bildpunkt (x,y); $K_a =$ additiver Korrekturwert;

Formel 7.2.: Korrektur mit dem additiven Korrekturwert Ka

Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß das Grauwerthistogramm beibehalten wird und nur einen Offset erfährt.

7.2.2. Multiplikativer Helligkeitsangleich

Beim multiplikativen Helligkeitsangleich wurde jeder Pixel des zu untersuchenden Testbildes mit einem Korrekturfaktor K_m multipliziert, der sich aus dem Quotienten der dunkelsten Region in diesem Bild und der lageentsprechenden Region im Referenzbild ergab (siehe Formeln 7.3. und 7.4.).
$$\label{eq:Km} \mathsf{K}_m = \left\{ \begin{array}{l} \mathsf{K}_{m,min} \mathsf{falls} \; \mathsf{M}_{Ref,i} \; / \; \mathsf{M}_i < \mathsf{K}_{m,min} \\ \\ \mathsf{M}_{Ref,i} \; / \; \mathsf{M}_i \mathsf{sonst} \end{array} ; \right.$$

$$\begin{split} M_{Ref,i} &= \text{mittlere Intensität der Region i des Referenzbildes}; \\ M_i &= \text{mittlere Intensität der dunkelsten Region i des zu korrigierenden Bildes}; \\ K_{m,min} &= \text{minimaler multiplikativer Korrekturfaktor}; \\ K_m &= \text{multiplikativer Korrekturfaktor}; \\ i &= \text{Regionenindex } (0...24); \end{split}$$

Formel 7.3.: Ermittlung eines multiplikativen Korrekturfaktors K_m

$$I_{hell}(x,y) = \begin{cases} 255 \text{falls } I_{sha}(x,y) * K_m > 255 \\ I_{sha}(x,y) * K_m \text{sonst} \end{cases};$$

für alle Bildpunkte (x,y)

$$\begin{split} I_{sha}(x,y) &= \text{Intensität des shadingkorrigierten Bildes beim Bildpunkt (x,y);} \\ I_{hell}(x,y) &= \text{Intensität des helligkeitskorrigierten Bildes beim Bildpunkt (x,y);} \\ K_m &= \text{multiplikativer Korrekturfaktor;} \end{split}$$

Formel 7.4.: Korrektur mit dem multiplikativen Korrekturfaktor K_m

Bei diesem Verfahren kann es sein, daß Grauwerte auf Grund der anschließenden Rundung der Pixel auf eine ganze Zahl, im Grauwerthistogramm nicht mehr erscheinen. Dieses muß aber nicht eine Verfälschung des Ergebnisses nach sich ziehen.

Kommt es dazu, daß der Korrekturfaktor K_m kleiner als z.B. eins ist, d.h. das zu untersuchende Bild wird dunkler, kann man eine 'Bremse' einführen, die Korrekturfaktoren, die kleiner als ein festgesetzter Wert $K_{m,min}$ sind (z.B. 1,0), nicht erlaubt. Somit werden Bilder mit flächendeckender Extravasation (also Bilder, die wirklich heller sind als ihre Referenzbilder) nicht fälschlich verdunkelt.

Die Güte dieser Verfahren wird in Kapitel 12.5.2. untersucht.

8. Lagekorrektur

8.1. Allgemeines

Die soweit bearbeiteten Bilder müssen nun zueinander ausgerichtet werden, das heißt, um ein Subtraktionsbild erstellen zu können, müssen die Aufnahmen der zu untersuchenden Bilder auf das Referenzbild ausgerichtet werden, da folgende Faktoren ein Verschiebung der Bilder untereinander verursachen können:

- respiratorische Schwankungen der Hirnoberfläche
- pulsatorische Lageänderung der Piagefäße
- vasomotorische Reaktionen der Piagefäße
- dreidimensionale Verschiebungen des Gewebes (z.B. Ödem)

Hierfür stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung:

- manuelle Lagekorrektur (Kapitel 8.2.)
- automatische Lagekorrektur (Kapitel 8.3.)

8.2. Manuelle Lagekorrektur

Die manuelle Lagekorrektur wurde ursprünglich im Labor angewendet (Schilling et al. [78]). Es handelt sich dabei um eine reine x,y-Verschiebung, d.h. um eine Korrektur die das Bild in x- sowie in y-Richtung dem Referenzbild angleicht. Im Unterschied zu der ursprünglich verwendeten Verschiebung wurde später das zu untersuchende Bild auf das Referenzbild korrigiert und nicht umgekehrt. Dies hat für die Auswertung keine Bedeutung, jedoch zum Betrachten der Bilder ist es angenehmer, da wichtige (und unwichtige) Bildbereiche immer an der selben Stelle des Monitors zu sehen sind. Es hat sich gezeigt, daß auch bei verschiedenen Anwendern des Lagekorrekturprogrammes eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht wird. Somit gehen keine anwenderspezifischen Ergebnisse in die Auswertung ein.

Die Korrektur besteht aus zwei Schritten:

- Ermittlung der Verschiebung (Kapitel 8.2.1.)
- Verschieben des zu untersuchenden Testbildes (Kapitel 8.2.2.)

8.2.1. Ermittlung der Verschiebung

Das Ermitteln der Verschiebungsdaten erfolgt getrennt und unabhängig von dem Auswertverfahren. Das publizierte Grundprogramm (Bultmann et al. [14] und Schilling et al. [78]) wurde geringfügig modifiziert.

Zunächst wurde das Referenzbild in den Bildspeicher geladen und jeder Pixel um 20 Graustufen verdunkelt, damit bei der anschließenden Subtraktion keine negativen Werte ermittelt würden, die auf dem Bildschirm als 'Null' dargestellt werden. Ohne diesen Schritt war es manchmal nicht möglich, eine Verschiebung zu bestimmen. Danach wurde das Bild, dessen Verschiebungsdaten bestimmt werden sollten, in den Bildspeicher geladen. Manuell wurde nun ein 128*128 Pixel großer Bereich etwa in der Mitte des Bildes bestimmt, der signifikante Strukturen zur Verschiebung enthielt. In diesem Fenster wurde das Subtraktionsbild (noch ohne Verschiebung) berechnet. Die Berechnung der Subtraktion wurde deshalb auf ein Fenster reduziert, da das Berechnen im gesamten Bildbereich für dieses Programm zu zeitaufwendig wäre. Nun wurde das zu untersuchende Bild in x- wie in y-Richtung pixelweise verschoben, bis man ein möglichst gutes Subtraktionsergebnis erhielt, das in dem ausgewählten Fenster dargestellt wurde. Zur besseren Darstellung konnte der Kontrast in dem Fenster nach Belieben verändert werden. Waren die beiden Bilder möglichst gut zur Deckung gebracht, wurden die x,y-Verschiebungsdaten als ganze Zahlen L_x und L_y in einer Datei gespeichert. Dabei bedeutet ein positives L_x eine ursprüngliche Verschiebung des zu untersuchenden Testbildes gegenüber dem Referenzbild nach rechts und ein positives L_v eine Verschiebung nach unten.

8.2.2. Verschieben des zu untersuchenden Bildes

Die Verschiebung war nun durch zwei Zahlen L_x und L_y repräsentiert, die im Auswertprogramm aus der Datei gelesen wurden. Das verschobene Bild wurde nun noch nach folgender Formel 8.1. berechnet:

$$I_{lage}(x,y) = \begin{cases} I_{hell}(x-L_x,y-L_y) \text{falls } (x-L_x,y-L_y) \\ \text{im Bereich } (0...502,0...511) \\ 0 \text{für alle Werte im Bereich } (0...502,0...511), \\ \text{die } (x-L_x,y-L_y) \text{ nicht angenommen hat} \end{cases};$$

für alle Bildpunkte (x,y)

$$\begin{split} I_{lage}(x,y) &= \text{Intensität des lagekorrigierten Bildes beim Bildpunkt (x,y);} \\ I_{hell}(x,y) &= \text{Intensität des helligkeitskorrigierten Bildes beim Bildpunkt (x,y);} \\ L_x &= \text{vorher ermittelte Verschiebung des Bildes in x-Richtung;} \\ L_y &= \text{vorher ermittelte Verschiebung des Bildes in y-Richtung;} \end{split}$$

Formel 8.1.: Verschiebung mit der manuellen Lagekorrektur

Wie aus der Formel 8.1. zu ersehen ist, werden die durch die Verschiebung nicht mehr gültigen Bildbereiche am Rand des Bildes zu 'Null' gesetzt. Die Bildgröße verringert sich also um L_x Spalten und L_v Zeilen.

8.3. Automatische Lagekorrektur

Die automatische Lagekorrektur arbeitet mit Hilfe des von Lenz [49] entwickelten Lagekorrekturprogrammes mit Namen 'estpar', das von mir für diesen Anwendungsfall angepaßt wurde (Findling [33]). Das Programm muß iterativ aufgerufen werden. Es berechnet je nach Ordnung die Parameter zur Verschiebung. Mit folgender Formel 8.2. wird dann die Verschiebung berechnet:

$$I_{lage}(x,y) = \begin{cases} I_{hell}(g_1(x,y),g_2(x,y)) \text{falls } (g_1(x,y),g_2(x,y)) \\ \text{im Bereich } (0...502,0...511) \\ 0 \text{für alle Werte im Bereich } (0...502,0...511), \\ \text{die } (g_1(x,y),g_2(x,y)) \text{ nicht angenommen hat} \end{cases}$$

mit

$g_1(x,y) = x$	+ q[0]	: Ordnung 0		
•	+ q[2] * x	+ q[4] * y	: Ordnung 1	
	+ q[6] * x*y		: Ordnung 2	
	+ q[8] * x*x	+ q[10] * y*y;	: Ordnung 3	

und

$g_2(x,y) = y$	+ q[1]		: Ordnung 0
-	+ q[3] * x	+ q[5] * y	: Ordnung 1
	+ q[7] * x*y		: Ordnung 2
	+ q[9] * x*x	+ q[11] * y*y;	: Ordnung 3

für alle Bildpunkte (x,y)

Ordnung 0: x,y-Verschiebung; Ordnung 1: affine Transformation; Ordnung 2: bilineare Transformation; Ordnung 3: quadratische Tranformation;

I_{lage}(x,y) = Intensität des lagekorrigierten Bildes beim Bildpunkt (x,y);
 I_{hell}(x,y) = Intensität des helligkeitskorrigierten Bildes beim Bildpunkt (x,y);
 q[0...11] = Über das Programm 'estpar' berechnete Parameter;

Formel 8.2.: Verschiebung mit der automatischen Lagekorrektur

Als zeitlich vertretbar und genügend genau haben sich folgende Kriterien für das Programm 'estpar' herausgestellt:

- Eine Berechnung mit Ordnung 2 ist ausreichend.
- Jedes Bild wird auf das zeitlich direkt vorangegangene Bild korrigiert, damit zum einen die zu berechnenden Verschiebungen so gering wie möglich gehalten

werden, und damit sich zum anderen die Bildinhalte der zu vergleichenden Bilder am wenigsten unterscheiden.

 Die endgültigen Verschiebungsparameter ergeben sich aus den neu berechneten. Diese werden mit denen des Vorgängerbildes verknüpft. So erhält man die Verschiebungsparameter, die das zu untersuchende Testbild mit dem Referenzbild zur Deckung bringen.

Die durch die Verschiebung neu hinzukommenden Flächen wurden zu Null gesetzt und zählten nicht zum Gültigkeitsbereich des Subtraktionsbildes.

Nach einigen Praxistests konnte man feststellen, daß bei stärkeren Extravasationen für die Verschiebungsparameter nicht nachvollziehbare Werte berechnet wurden und auch bei visueller Beobachtung der Lagekorrektur konnte man falsche Ergebnisse betrachten. Dieses Phänomen muß man auf die starke Abweichung eines Bildes mit Extravasation zu einem Vorgängerbild ohne Extravasation zurückführen. Dabei kann es vorkommen, daß sich die Intensität der Gefäße gegenüber dem Hintergrund umkehrt und dadurch das Programm keine vernünftigen Anhaltspunkte mehr finden kann. Ob es dennoch zu guten Ergebnissen führt wird in Kapitel 12.5.6. untersucht.

9. Subtraktion und Rauschminderung

9.1. Subtraktion

Durch die Bildsubtraktion wird der Gefäßbaum eliminiert, die Extravasationen jedoch werden hervorgehoben. Außerdem ermöglicht die Subtraktion eine Vergleichbarkeit verschiedener Beobachtungsareale, da unterschiedliche Helligkeitsniveaus verschiedener Areale nivelliert werden. Zur Subtraktion wurde das Referenzbild von dem lagekorigierten Bild pixelweise laut Formel 9.1. subtrahiert. Dabei sind zwei Punkte zu berücksichtigen:

- Eventuelle negative Werte d
 ürfen zun
 ächst nicht unterschlagen werden. Da aber keine negativen Grauwerte dargestellt oder abgespeichert werden k
 önnen, wird ein Grauwertoffset I_{offset} zu jedem Bildpunkt nach der Subtraktion addiert.
- Ungültige Bildbereiche, wie z.B. fehlende Randbereiche, die bei der Lagekorrektur mit dem Grauwert 0 markiert wurden, werden ohne Grauwertoffset I_{offset} als 0 abgespeichert.

$$I_{sub}(x,y) = \begin{cases} 0 \text{ falls } I_{lag}(x,y) = 0 \\ I_{lag}(x,y) - I_{shaRef}(x,y) + I_{offset} \text{ sonst} \end{cases};$$

für alle Bildpunkte (x,y)

$$\begin{split} I_{sub}(x,y) &= \text{Intensität des Subtraktionsbildes beim Bildpunkt (x,y);} \\ I_{lag}(x,y) &= \text{Intensität des lagekorrigierten Bildes beim Bildpunkt (x,y);} \\ I_{shaRef}(x,y) &= \text{Intensität des shadingkorrigierten Referenzbildes beim Bildpunkt (x,y);} \\ I_{offset} &= \text{Grauwertoffset;} \end{split}$$

Formel 9.1.: Ermittlung des Subtraktionsbildes

Gleichzeitig mit der Subtraktion wurde die Pixelanzahl des gültigen Bildbereiches ermittelt, um den Extravasationswert berechnen zu können. Als Grauwertoffset wurde **I_{offset}=120** gesetzt. Damit sind negative Werte bei der Subtraktion praktisch ausgeschlossen.

9.2. Rauschminderung durch Medianfilterung

Nach der Subtraktion wird das Bild einer Medianfilterung mit einem 3*3-Kernel unterzogen. (Zur Medianfilterung und zum Begriff 'Kernel' siehe Anhang Kapitel A1..) Dies dient einer Rauschminderung wie Abbildung 9.1. zeigt und damit einer Bildverbesserung für die Subtraktionsbildnachbearbeitung, da der Grauwertbereich nach der Subtraktion nur noch wenige Intensitätsstufen groß ist.



Abbildung 9.1.: Rauschminderung durch Medianfilterung

Die drei Subtraktionsbilder, die dabei zugrunde liegen, wurden jeweils aus zwei aufeinanderfolgenden zehnfach gemittelten Bildern einer Bildsequenz gewonnen. Dabei stammt Bild 1 von einem 'in vitro'-Bild, Bild 2 von einem dunklen Referenzbild und Bild 3 von einem hellen Referenzbild. Die Y-Koordinate gibt den Prozentsatz aller Pixel an, die innerhalb des folgenden Bereiches liegen:

-Grauwertschranke ≤ Intensität des Pixels ≤ +Grauwertschranke

Die Medianfilterung ergibt in jedem Fall eine geringere Streuung um den Mittelwert Null. Der Grauwertoffset ist dabei schon berücksichtigt.

Die Medianfilterung ist im Anhang Kapitel A1. näher beschrieben

10. Subtraktionsbildnachbearbeitung

10.1. Allgemeines

Unter Subtraktionsbildnachbearbeitung versteht man die Bearbeitung des Subtraktionsbildes um das Ergebnis zu verbessern. So gesehen ist auch die unter Kapitel 9.2. beschriebene Medianfiltertung eine Subtraktionsbildnachbearbeitung. Die Medianfilterung soll jedoch als Vorbereitung für die folgenden Verfahren verstanden werden und ist fester Bestandteil des endgültig ermittelten Gesamtverfahrens, wie es in Kapitel 12. beschrieben wird. Die in den folgenden Kapitel beschriebenen Verfahren können auch miteinander kombiniert werden.

10.2. Helligkeitsangleich nach der Subtraktion

Bei dieser Art des Angleichens wird aus jedem Grauwerthistogramm der Subtraktionsbilder ein Nullpunkt I_{Nullpunkt} berechnet, der das Helligkeitsniveau des Subtraktionsbildes repräsentiert. Dabei ist nun wichtig, daß bei der Subtraktion die negativen Werte berücksichtigt werden. Dieser Nullpunkt I_{Nullpunkt} kann auf die drei folgenden Arten ermittelt werden. Er ersetzt somit den bei der Subtraktion eingeführten Wert I_{offset}, sollte aber größenordnungsmäßig um dessen Wert von 120 liegen.

Ein Grauwerthistogramm gibt die Häufigkeit jedes Grauwertes von 0 bis 255 in einem Bild an. Es besteht demnach aus 256 Werten. Die Abbildung 10.1. zeigt zur Veranschaulichung ein Beispiel eines Grauwerthistogramms:



Abbildung 10.1.: Beispiel eines Grauwerthistogramms

Wird keines der drei Verfahren verwendet, gilt: $I_{Nullpunkt} = I_{offset}$. Trotzdem kann das Bild über die in Kapitel 10.2.4. beschriebenen Verfahren bearbeitet werden.

10.2.1. Helligkeitsangleich über den Maximalwert

Bei diesem Verfahren wird I_{Nullpunkt} gleich dem Grauwert gesetzt, bei dem das Grauwerthistogramm ein Maximum hat. Um dabei positive wie negative Überläufe zu berücksichtigen, werden die Werte 0 sowie 255 ausgeschlossen, so daß I_{Nullpunkt} Werte im Bereich von 1 bis 254 annehmen kann.

10.2.2. Helligkeitsangleich über den Medianwert

Hier wird **I**_{Nullpunkt} gleich dem Grauwert gesetzt, oberhalb dem gleich viele Grauwerte liegen, wie unterhalb (Median). Dieses ist aber nur für eine ungerade Anzahl gültiger Grauwerte möglich. Falls die Anzahl der gültigen Werte gerade ist, wird der Mittelwert zwischen den beiden Grauwerten oberhalb, wie unterhalb derer gleich viele Grauwerte liegen, berechnet und zu einer ganzen Zahl gerundet,

Der Wert Null wird bei der Berechnung nicht berücksichtigt, da dieser den durch die Lageverschiebung verursachten Rand darstellt, der nicht zum Gültigkeitsbereich des Bildes gehört. **I_{Nullpunkt}** kann also Werte im Bereich von 1 bis 255 annehmen.

10.2.3. Helligkeitsangleich über den Mittelwert

Beim dritten Verfahren wird der Mittelwert des Bildes berechnet und der auf eine ganze Zahl gerundete Wert wird **I_{Nullpunkt}** zugeordnet. Auch hier wird die Null aus oben genanntem Grund nicht berücksichtigt. Dieser Wert muß natürlich nicht aus dem Grauwerthistogramm bestimmt werden, sondern kann auch aus dem Bild selbst ohne Ermittlung des Histogramms berechnet werden.

10.2.4. Möglichkeiten der Bildbearbeitung

Nachdem I_{Nullpunkt} bestimmt wurde, kann das Histogramm auf verschiedene Weise bearbeitet werden, um das Ergebnis zu optimieren.

10.2.4.1. Hochpaß

Unter Hochpaß muß man hier das Löschen aller Pixel verstehen, deren Grauwert kleiner als ein vorgegebener Wert bezogen auf $I_{Nullpunkt}$ sind. Ausgehend von $I_{Nullpunkt}$ selber kann die Schranke N_{H} nach oben, wie nach unten verschoben werden. Hochpaß bedeutet also z.B., daß alle Grauwerte, die kleiner als $I_{Nullpunkt}+5$ sind, gelöscht werden. Dabei ist der Wert +5 die Schranke N_{H} ($N_{H}=5$).

Untersucht wird zunächst das Verhalten bei einer Schranke von Null (N_H=0). Falls das Verfahren Erfolg versprechend erscheint, wird die Schranke N_H variiert.

10.2.4.2. Bandsperre

Hierbei werden nur die Grauwerte berücksichtigt, die außerhalb eines Bereiches um den Wert I_{Nullpunkt} liegen, z.B.: Der Wert I_{Nullpunkt} sei 121 und der Bereich sei 4 (**N**_B=4). Das bedeutet, daß alle Grauwerte, die größer als 121-4=117 und zugleich kleiner als 121+4=125 sind, gelöscht werden. Ist der Bereich gleich Null (**N**_B=0), so bleibt das Histogramm unverändert. Hier wird ebenfalls zunächst das Verhalten bei einem Bereich von Null untersucht (**N**_B=0), bevor der Bereich variiert wird.

10.3. Strukturelimination

Die Strukturelimination ist ein Verfahren, das schon früher im Labor Anwendung fand (Bultmann et al. [14], Findling et al. [34] und Schilling et al. [78]). Es besteht aus zwei Schritten: der Datenermittlung und der Bildbearbeitung.

10.3.1. Datenermittlung

Bei der Datenermittlung wird das Bild in den vier Hauptrichtungen nach zusammenhängenden Strecken untersucht. Die vier Hauptrichtungen sind:

- horizontal
- vertikal
- diagonal von links oben nach rechts unten
- diagonal von rechts oben nach links unten

Das Programm 'tastet' das Bild in jeder der vier Richtungen ab und zählt die Anzahl zusammenhängender Strecken gleicher Länge getrennt für jede der vier Richtungen. Als zusammenhängende Strecken werden hier Bildpunktfolgen bezeichnet, die keinen Bildpunkt mit dem Wert Null enthalten und entweder vom Bildrand oder von Bildpunkten mit dem Wert Null begrenzt sind. Folgende Bildpunktgrauwertfolge hätte demnach die Länge fünf:

0 0 12 13 15 13 7 Bildrand

Somit erhält man vier Längenverteilungshistogramme, bei denen jeder Länge die Anzahl der in dieser Richtung gefundenen Strecken dieser Länge zugeordnet ist. Von diesen Histogrammen wird getrennt der Längengrenzwert ermittelt, unterhalb dem eine bestimmte Prozentzahl **LG** (z.B. 60% (**LG**=60)) der gezählten Längen liegen. Das Ergebnis sind demnach vier Längengrenzwerte, die für das folgende Kapitel benötigt werden.

In früheren Publikationen (Bultmann et al. [14], Findling et al. [34,35] und Schilling et al. [78]) war der Medianwert der gezählten Längen als Längengrenzwert fest vorgegeben worden, der hier somit der Prozentzahl **LG**=50(%) entspricht.

10.3.2. Bildbearbeitung

Hier wird nun das Bild ebenfalls in den vier Richtungen 'abgetastet' und es werden alle diejenigen Strecken aus dem Bild gelöscht, deren Längen kleiner oder gleich den entsprechenden Längengrenzwerten sind.

10.3.3. Probleme

Das Verfahren hat bisher mit den Medianwerten einigermaßen brauchbare Ergebnisse geliefert. Es war dabei die Idee, durch Löschen kurzer Strecken und Beibehalten längerer Strecken schmale Strukturen, wie sie von Dilatationen verursacht sein können, zu eliminieren und kompaktere Formen (z.B. durch punktförmiges Ausbreiten einer Extravasation) beizubehalten.

Als Voraussetzung für dieses Verfahren müssen jedoch mindestens alle Grauwerte kleiner $I_{offset} + N_H$ zu Null gesetzt werden.

Ein weiteres Problem tritt auf, wenn das ganze Bild ungleich Null ist, d.h. eine flächendeckende Extravasation aufgetreten ist. Falls dieser Fall eintritt, würde auf Grund der sehr hohen Längenwerte das ganze Bild gelöscht werden und ein fälschlicher Extravasationswert von Null berechnet werden (siehe Kapitel 11.), obwohl starke Extravasationen im Bild zu erkennen sind. Um dieses Problem zu umgehen werden in solch einem Fall (wenn der horizontale oder der vertikale Längengrenzwert größer als 450 sind) alle ermittelten Längengrenzwerte zu 'eins' gesetzt. Dies stellt für das so bearbeitete Bild ein Weglassen dieses Bearbeitungsschrittes dar. Wenn im nächsten Bild dieses Problem nicht auftaucht, kann es zu einem vermeintlich hohen Abfall des Extravasationswertes führen. Jedoch tritt dieses nur bei Bildern auf, in denen der Extravasationswert ohnehin sehr hoch ist.

10.4. Gefäßbaumelimination

10.4.1. Methode

Ziel dieses Verfahrens sollte sein, den Gefäßbaum aus dem zu untersuchenden Bild zu löschen, so daß nur der Hintergrund mit seinen möglichen Extravasationen als gültiger Bildbereich übrigbleibt. Dazu wurde das zu untersuchende shadingkorrigierte Bild zunächst in folgenden acht Richtungen nach Intensitätssprüngen abgetastet:

- horizontal von links nach rechts
- horizontal von rechts nach links
- vertikal von oben nach unten
- vertikal von unten nach oben
- diagonal von links oben nach rechts unten
- diagonal von rechts unten nach links oben
- diagonal von rechts oben nach links unten
- diagonal von links unten nach rechts oben

Wenn der Intensitätssprung von einem Pixel zum nächsten über einer positiven Grenze lag, wurde dieser Pixel und alle folgenden markiert, bis ein negativer Sprung oberhalb einer anderen Grenze die Markierung wieder abgeschaltet hat. So erhielt man ein mit horizontalen, vertikalen und diagonalen Linien durchzogenes Bild. Auf dieses Bild wurden die aus Kapitel 6.3.2. bekannten Algorithmen 1 und 2 in folgender Reihenfolge angewandt:

Algorithmus 1 Algorithmus 2 Algorithmus 2 Algorithmus 1 Algorithmus 1 Algorithmus 1 Algorithmus 2 Algorithmus 2 Algorithmus 2 Algorithmus 2 Algorithmus 1 Algorithmus 1

Somit wurden ein- und zweipixelbreite Linien gelöscht bzw. ein- und zweipixelbreite Lücken geschlossen und man hat eine 'Maske' gewonnen, mit der man nach der Subtraktion Reste des Gefäßbaumes aus dem Bild eliminieren konnte. Dazu mußte man diese Maske genau wie das zu untersuchende Bild lagekorrigieren, und alle Pixel, die in der lagekorrigierten Maske ungleich Null waren, aus dem Subtraktionsbild löschen.

10.4.2. Probleme

Vorraussetzung für das Verfahren war, daß die Gefäße heller im Bild erscheinen, als der Hintergrund. Im Verlaufe eines Versuchsfeldes zeigt sich jedoch, daß sich die Helligkeitsbeziehungen umkehren, d.h. der Hintergrund erscheint zu späteren Versuchszeitpunkten heller als die Gefäße. Spätestens zu diesen Zeitpunkten, aber meistens auch schon kurz davor versagte dieses Verfahren und lieferte Ergebnisse, die mit der Intention zu dieser Methode nicht zu vereinbaren waren. Auch eine Helligkeitsschranke, ab der kein Sprung erkannt werden sollte, konnte die zum Teil fatale Wirkung nicht mildern. Daher wurde diese Methode wieder verworfen.

10.5. Methode der Mustererkennung

Hier wurde versucht, die im Subtraktionsbild bestehenden Areale, die ungleich Null sind, nach verschiedenen Kriterien, wie z.B. Fläche oder Umfang, zu charakterisieren. Damit wollte man Beschreibungskriterien erhalten, mit denen man Areale, die von Extravasationen stammen, von anderen Arealen unterscheiden kann, die z.B. vom Gefäßbaum stammen. Diese Methode wurde von mir in Findling [33] entwickelt und untersucht. Ich kam aber zu dem Ergebnis, daß diese Methode keine genügend signifikanten Unterscheidungsmerkmale liefert. Somit wurde von der Anwendung dieser Art von Mustererkennung Abstand genommen.

10.6. Flächenelimination

Diese Verfahren entstand, nachdem das neue Auswertverfahren im Prinzip schon ermittelt war. Beim Betrachten der Ergebnisbilder konnte man feststellen, daß viele kleine Flächen in den Bildern verstreut waren, die keine Extravasationen enthalten und demnach keinen Beitrag zum Extravasationswert beitragen sollten. In der Hoffnung, das Ergebnis weiter zu verbessern, wurde das Verfahren der Flächenelimination eingeführt, das kleine Flächen aus dem Bild löscht.

Das Bild wird nach zusammenhängenden Flächen ungleich 'Null' (also Flächen, deren Pixel, die ungleich 'Null' sind, zusammenhängen) durchsucht und deren Pixel werden je Fläche gezählt. Unterschreitet die Anzahl der Pixel einer Fläche einen vorher festgesetzten Wert **F** (Flächengrenzwert) wird diese Fläche aus dem Bild gelöscht. Das Ermitteln einer zusammenhängenden Fläche geschieht mit Hilfe der 'Vierernachbarschaft' der Pixel, die auch in Kapitel 6.3.2. verwendet wurde. Daher sollte vorher das Verfahren der Strukturelimination (Kapitel 10.3.) angewandt werden, um einzelne Flächen klar voneinander zu trennen.

11. Extravasationswertbestimmung

Als Ergebnis will man für jedes untersuchte Bild einen Wert in Form einer reellen Zahl erhalten, der ein Maß für die Extravasation in diesem Bild darstellt. Dieser Wert wird Extravasationswert, oder kurz Ef-Wert genannt, und wird mit dem Kürzel 'Ef' bezeichnet. Man erhält ihn aus dem Mittelwert des nachbearbeiteten Subtraktionsbildes (Formel 11.1.).

$Ef = \frac{\sum Intensität aller gültigen Bildpunkte}{Anzahl aller gültigen Bildpunkte};$

Formel 11.1.: Berechnung des Extravasationswertes Ef

Gültige Bildpunkte sind dabei die Bildpunkte, die nach der Lageverschiebung noch im gültigen Bildbereich verblieben sind, d.h. alle die Bildpunkte, die nach der Lageverschiebung ungleich dem Wert Null sind.

Vom Extravasationsgrad El zu einem bestimmten Zeitpunkt spricht man dann, wenn die Ef-Werte gleichartiger Versuche zu diesem Zeitpunkt gemittelt werden. Dieser Wert wird in Kapitel 13. verwendet.

12. Gütevergleich

12.1. Allgemeines

Nachdem nun alle Methoden, die das Auswertverfahren bieten kann, beschrieben wurden, mußte eine Möglichkeit gefunden werden, mit der man verschiedene Verfahren miteinander vergleichen kann. Das Ergebnis sollte **eine** reelle Zahl sein, die die Güte eines Verfahrens charakterisiert. Es wurden dazu zwei unterschiedliche Verfahren angewendet, die einen solchen Wert liefern: zum einen ein Verfahren, das eine sogenannte Fehlgüte **G** liefert, zum anderen die Spearmansche Rangkorrelation bei Bindungen mit dem Rangkorrelationskoeffizienten **r**_{S.B}.

Um überhaupt Ergebnisse zu erhalten, muß man komplette Verfahren anwenden. Hierzu wurden bewußt vier Versuchstage mit jeweils vier Beobachtungsfeldern ausgewählt, deren Grundhelligkeiten und deren Versuchsparameter unterschiedlich waren, so daß ein Verfahren gefunden werden konnte, das bei unterschiedlichsten Versuchsbedingungen angewandt werden kann.

12.2. Berechnung der Fehlgüte

Ausgangspunkt zur Berechnung der Fehlgüte **G** sind verschiedene Versuchsfelder mit **n** zu untersuchenden Bildern **T**_i (**i=1..n**) und ihren zugehörigen Referenzbildern. Die Bilder **T**_i müssen hinsichtlich ihres Extravasationsgrades kategorisiert werden, wobei vier Stufen (**E**₀...**E**₃) vergeben werden (Die Referenzbilder müssen vom Extravasationsgrad **E**₀ sein und sind es bei den folgenden Untersuchungen auch. Falls dies nicht der Fall sein sollte, werden bei der Subtraktion Extravasationsareale aus den zu untersuchenden Bildern gelöscht.):

Diese Einteilung dient als Vergleichsgrundlage zur Berechnung der Fehlgüte **G** der unterschiedlichen Verfahren, da sie nach menschlicher Beobachtung eine Referenz darstellt. Die Einteilung wurde von drei erfahrenen Beobachtern unabhängig voneinander vorgenommen. Bei unterschiedlicher Beurteilung wurde der gerundete Mittelwert als wahrer Wert angenommen. Dabei hat es sich gezeigt, daß es häufig

schwierig ist, die Bilder eindeutig diesem Schema zu unterziehen, so daß auch ein sehr gutes automatisches Verfahren nicht unbedingt für ein einzelnes Bild ein absolut wahres Ergebnisse liefern muß, daß man aber bei der Mittelung gleichartiger Versuchszustände brauchbare Ergebnisse erhalten kann.

Die Verfahren liefern Ef-Werte, die beliebige reelle Zahlen sein können. Um diese Ef-Werte mit der oben genannten Einteilung vergleichen zu können, wurden drei Grenzen S_0 , S_1 und S_2 eingeführt, die jeden Ef-Wert (hier **ef**_i für jedes Bild T_i) nach folgender Formel 12.1. in eine von vier Klassen ($K_0...K_3$) einteilt:

ef _i ≤ S ₀	: ef _i ∈ K ₀ (Klasse 0);
S ₀ < ef _i ≤ S ₁	: ef _i ∈ K ₁ (Klasse 1);
S ₁ < ef _i ≤ S ₂	: ef _i ∈ K ₂ (Klasse 2);
S ₂ < ef _i	: ef _i ∈ K ₃ (Klasse 3);

mit

i = 1...n;

$$\begin{split} S_0...S_2 &= \text{Grenzen zur Klasseneinteilung der Ef-Werte;} \\ ef_i &= \text{Ef-Wert des Bildes } T_i; \\ n &= \text{Anzahl der Bilder } T_i; \\ K_0...K_3 &= \text{Klassen der Ef-Werte;} \end{split}$$

Formel 12.1.: Klassen K₀...K₃ der Ef-Werte ef_i

Jedes zu untersuchende Bild T_i ist somit einem Extravasationsgrad E_k und einer Klasse K_m zugeordnet (mit m=0...3 und k=0...3). Im Idealfall sollte dabei die Ordnung k des Extravasationsgrad der Ordnung m der Klasse entsprechen (m=k). Falls dem nicht so ist, wird dem Bild T_i (repräsentiert durch den Ef-Wert ef_i) nach folgender Formel 12.2. ein Fehlergrad F_i zugeordnet:

 $T_i \in E_0 \land ef_i \in K_0 \implies F_i = 0$ $T_i \in E_0 \land ef_i \in K_1 \implies F_i = 1$ $T_i \in E_0 \land ef_i \in K_2 \Rightarrow F_i = 2$ $T_i \in E_0 \land ef_i \in K_3 \Rightarrow F_i = 3$ $T_i \in E_1 \land ef_i \in K_0 \Rightarrow F_i = 1$ $T_i \in E_1 \land ef_i \in K_1 \implies F_i = 0$ $T_i \in E_1 \land ef_i \in K_2 \implies F_i = 1$ $T_i \in E_1 \land ef_i \in K_3 \Rightarrow F_i = 2$ $T_i \in E_2 \land ef_i \in K_0 \Rightarrow F_i = 2$ $T_i \in E_2 \land ef_i \in K_1 \implies F_i = 1$ $T_i \in E_2 \land ef_i \in K_2 \Rightarrow F_i = 0$ $T_i \in E_2 \land ef_i \in K_3 \Rightarrow F_i = 1$ $T_i \in E_3 \land ef_i \in K_0 \implies F_i = 3$ $T_i \in E_3 \land ef_i \in K_1 \implies F_i = 2$ $T_i \in E_3 \land ef_i \in K_2 \implies F_i = 1$ $T_i \in E_3 \land ef_i \in K_3 \Rightarrow F_i = 0$

oder kurz

 $T_i \in E_k \land ef_i \in K_m \Rightarrow F_i = abs(m-k);$

mit

m=0...3, k=0...3 und i=1...n;

$$\begin{split} T_i &= \text{zu analysierendes Bild};\\ ef_i &= \text{Ef-Wert des Bildes }T_i;\\ E_0...E_3 \left(E_k \right) &= \text{Extravasationsgrad des Bildes }T_i;\\ K_0...K_3 \left(K_m \right) &= \text{Klassen der Ef-Werte ef}_i;\\ n &= \text{Anzahl der Bilder }T_i;\\ F_i &= \text{Fehlergrad des Bildes }T_i; \end{split}$$

Formel 12.2.: Fehlergrad F_i der Bilder T_i

Der Fehlergrad F_i ist also die absolute Differenz (**abs(m-k)**) der Ordnungen **m** und **k** der Klasse K_m und des Extravasationsgrades E_k (mit **m=0...3** und **k=0...3**), die einem Bild zugeordnet wurden.

Die Fehlgüte **G** eines Verfahrens bestimmt sich aus der Summe der Fehlergrade F_i aller Bilder T_i normiert auf die dreifache Bilderanzahl (3 * n) und mit 100% multipliziert (siehe Formel 12.3.), so daß die Fehlgüte **G** theoretisch im Bereich zwischen 0% und 100% liegt.

$$G = \frac{\sum_{i=1}^{n} F_{i}}{3 * n} * 100\%;$$

$$G = Fehlgüte;$$

n = Anzahl der Bilder T_i ; F_i = Fehlergrade der Bilder T_i ;

Formel 12.3.: Fehlgüte G

Die Schranken $S_0...S_2$ wurden dabei aus den Ef-Werten so bestimmt (unter Berücksichtigung der vorher zugeordneten Extravasationsgrade $E_0...E_3$), daß sich für die Fehlgüte **G** der geringste Wert ergab. Je geringer die Fehlgüte **G** ist, desto größer ist die Übereinstimmung mit der Beobachtung. Dazu wurden die ermittelten Ef-Werte zunächst der Größe nach geordnet, und S_0 wurde der kleinste Ef-Wert zugeordnet. S_1 wurde der zweitkleinste Wert zugeordnet und S_2 wurden daraufhin nacheinander alle anderen Ef-Werte zugeordnet. Danach wurde der nächstgrößere Wert S_1 zugeordnet u.s.w. bis zu allen Kombinationen unter der Bedingung $S_0 \le S_1 \le S_2$ eine Fehlgüte **G** berechnet werden konnte. Die kleinste Fehlgüte **G** ist dann repräsentativ für das getestete Verfahren. Mit den entsprechenden Schranken $S_0...S_2$ erhält man Anhaltspunkte über das Ausmaß einer Extravasation bei einem vorliegenden Ef-Wert, der mit diesem Verfahren ermittelt wurde.

12.3. Rangkorrelation nach Spearman

Eine zweite Methode zur Beurteilung der Güte eines Verfahrens stellt die Spearmansche Rangkorrelation bei Bindungen dar, wie sie von Sachs [76] beschrieben wird. Voraussetzung hierfür sind zwei Datenreihen **a** und **b**, die korreliert werden. Die erste feste Datenreihe **a** besteht aus den zugeordneten Extravasationsgraden **E**_k (mit **k=0...3**) der einzelnen Bilder **T**_i (siehe Kapitel 12.2.). Die zweite Datenreihe **b** besteht aus den berechneten Ef-Werten **ef**_i eines zu untersuchenden Verfahrens, so daß es für jedes Bild einen zugeordneten Extravasationsgrad und so viele Ef-Werte gibt, wie Verfahren, die untersucht werden sollen.

Zur Ermittlung des Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten bei Bindungen $r_{S,B}$ werden zunächst die Werte der Datenreihen der Größe nach numeriert; gleiche Werte (=Bindungen) erhalten den Mittelwert aus den zugeordneten Numerierungen nach folgendem Beispiel mit der Anzahl **n**=10:

Aus	0,5	0,7	0,4	0,45	0,5	0,3	0,7	1,5	0,7	2,0
wird	4	6	2	3	5	1	8	9	7	10
und schließlich	4,5	7	2	3	4,5	1	7	9	7	10

Diese Numerierungen werden als Ränge bezeichnet. Man besitzt nun zwei rangnumerierte Datenreihen der Länge **n** (aus Extravasationsgrad und berechnetem Ef-Wert). Für jedes der **n** Datenpaare (**n** ist nun die Anzahl der untersuchten Bilder) wird nun die sogenannte Rangdifferenz **D**_i berechnet. Dieses sind die Differenzen der zugeordneten Ränge der zwei Datenreihen **a** und **b**.

Zusätzlich muß die Anzahl der Bindungen getrennt für die zwei Datenreihen **a** und **b** berücksichtigt werden. Das obere Beispiel (z.B. Datrenreihe **b**) enthält zwei Bindungsgruppen: eine mit der Länge 2 (Rang 4,5) und eine mit der Länge 3 (Rang 7). Zur Berücksichtigung der Bindungen benötigt man die Werte C_a und C_b der zwei Datenreihen, die nach folgender Formel 12.4. bestimmt werden:

$$C_a = \frac{1}{2} * \sum_{i_a} (c_a^3 - c_a); C_b = \frac{1}{2} * \sum_{i_b} (c_b^3 - c_b);$$

 $C_{a,b}$ = Werte zur Berücksichtung der Bindungen; $j_{a,b}$ = Anzahl der Bindungsgruppen; $c_{a,b}$ = Länge einer Bindung;

Formel 12.4.: Berücksichtigung der Bindungen

Somit erhält man für das obige Beispiel $C_b=1/2 * [(2^3 - 2)+(3^3 - 3)]=15$ und man kann nun die Spearmansche Rangkorrelation bei Bindungen $r_{S,B}$ laut Formel 12.5. bestimmen.

$$r_{S,B} = 1 - \frac{6 * \sum_{i=1}^{n} D_i^2}{(n^3 - n) - (C_a + C_b)};$$

 $r_{S,B}$ = Spearmansche Rangkorrelation bei Bindungen; $n = Anzahl der Bilder T_i;$ $C_{a,b}$ = Werte zur Berücksichtung der Bindungen; D_i = Rangdifferenzen der Bilder $T_i;$

Formel 12.5.: Spearmansche Rangkorrelation bei Bindungen r_{S,B}

Der Spearmansche Rangkorrelationskoeffizient $\mathbf{r}_{S,B}$ kann Werte zwischen -1,0 und +1,0 annehmen, wobei +1,0 eine optimale Korrelation darstellt. Der Wert Null besagt, daß zwischen den Datenreihen keine Korrelation besteht. Negative Werte deuten auf eine umgekehrte Beziehung, die in dieser Untersuchung auf schlechte Verfahren hinweisen und nicht zu gebrauchen sind.

Diese zweite Methode zur Beurteilung der Güte verschiedener Verfahren diente als Referenz bei nicht entschiedener Beurteilung durch das Verfahren der Fehlgüte und zur Bestätigung dieses ersten Verfahrens. Der Nachteil liegt darin, daß dieses Verfahren, im Gegensatz zum Verfahren der Fehlgüte, keine Grenzen zwischen den Extravasationsgraden liefert.

12.4. Verwendete Bilder

Zur Untersuchung wurden 279 Bilder herangezogen mit 16 Referenzbildern und n=263 zu untersuchenden Bildern. Die Extravasationsgradzuordnung lautet wie folgt:

Extravasationsgrad 0 (E ₀):	136 Bilder
Extravasationsgrad 1 (E ₁):	18 Bilder
Extravasationsgrad 2 (E ₂):	33 Bilder
Extravasationsgrad 3 (E ₃):	76 Bilder

Es ergeben sich nun folgende vier Trivialfälle bei der Klasseneinteilung der Ef-Werte in die Klassen K_0 bis K_3 :

- a) Die Ef-Werte aller Bilder werden der Klasse K₀ zugeordnet.
- b) Die Ef-Werte aller Bilder werden der Klasse K₁ zugeordnet.
- c) Die Ef-Werte aller Bilder werden der Klasse K₂ zugeordnet.
- d) Die Ef-Werte aller Bilder werden der Klasse K3 zugeordnet.

Zu jedem der vier Fälle läßt sich die Fehlgüte **G** berechnen, wie es im folgenden gemacht wird:

zu a)

$$G_{a)} = \frac{136^{*}0 + 18^{*}1 + 33^{*}2 + 76^{*}3}{263^{*}3} * 100\% = 39,54\%$$

zu b)

$$G_{b)} = \frac{136^{*}1 + 18^{*}0 + 33^{*}1 + 76^{*}2}{263^{*}3} * 100\% = 40,68\%$$

zu c)

$$G_{c)} = \frac{136^{*}2 + 18^{*}1 + 33^{*}0 + 76^{*}1}{263^{*}3} * 100\% = 46,39\%$$

zu d)

$$G_{d)} = \frac{136^{*}3 + 18^{*}2 + 33^{*}1 + 76^{*}0}{263^{*}3} * 100\% = 60,46\%$$

Das heißt , daß für die Fehlgüte **G** schlechtestenfalls der Wert 39,54% ermittelt werden kann (Fall a)). Der Bereich für die ermittelbaren Fehlgüten **G** liegt damit lediglich zwischen 0% und 39,54% und nicht, wie theoretisch möglich, zwischen 0% und 100%.

Mit der bekannten Extravasationsgradzuordnung kann man nun auch den maximalen Rangkorrelationskoeffizienten abschätzen. Dazu wurde zunächst die Annahme gemacht, daß die optimal berechneten Ef-Werte ohne Bindungen sind. Somit erhält man für C_a den Wert $C_a=1/2^*[(136^3-136)+(18^3-18)+(33^3-33)+(76^3-76)]=1497969$ (Extravasationsgradzuordnung) und für C_b den Wert Null (keine Bindungen). Daraus ergibt sich (mit n=263) für den Rangkorrelationskoeffizienten $r_{S,B}$ der Wert 0,767195. Spätere Ergebnisse zeigten, daß auch höhere Ergebnisse erreicht werden. Dieses kommt daher, daß Bindungen auch bei den Ef-Werten auftreten und damit $C_b > 0$ ist. Man kann jedoch nicht sagen, daß jeder Wert über 0,767195 für $r_{S,B}$ eine optimale Korrelation darstellt, da durch die Bindungen bei den Ef-Werten auch bei nichtoptimaler Zuordnug Werte größer als 0,767195 errechnet

werden können. Bezieht man nun bei einer Abschätzung Bindungen ein, die z.B. durch einen Hochpaß verursacht werden können (siehe Kapitel 10.2.4.), erhält man einen Rangkorrelationskoeffizienten r_{S.B} von 0,774488, wenn man die Hälfte der Ef-Werte, die sich auf die Extravasationsklasse E₀ beziehen, zu Null setzt (C_b=157182). Setzt man alle diese Ef-Werte zu Null (Anzahl: 136) erhält man einen Rangkorrelationskoeffizienten r_{SB} von 0,829705 (C_b=1257660). Der Wert 1 für r_{SB} kann nur dadurch erreicht werden, daß alle Rangdifferenzen Di Null sind, d. h. daß auch alle berechneten Ef-Werte entsprechende Bindungen besitzen, wie sie von den Extravasationsgradzuordnungen vorgegeben wurden. Dieses ist jedoch nicht unbedingt das Ziel des Verfahrens. Die Extravasationsgradzuordnung soll Anhaltspunkt zur Beurteilung des Verfahrens sein. Dabei ist es jedoch von hauptsächlicher Bedeutung, daß die Extravasationsklassen klar voneinander getrennt werden. Für Werte des Rangkorrelationskoeffizienten r_{S.B} um etwa 0,80 kann somit keine entscheidende Wertung des Verfahrens mehr stattfinden, da Schwankungen um diese Werte sowohl von den Bindungen bei den berechneten Ef-Werten als auch von wirklichen Verbesserungen bei gleichbleibender Anzahl der Bindungen stammen können. Hier sind also primär sie Werte der Fehlgüte zu berücksichtigen, die wirklich ausschließlich auf eine Veränderung der Klassenzugehörigkeit reagieren.

12.5. Ermittlung eines verbesserten Verfahrens

In diesem Kapitel wird beschrieben, wie schrittweise ein neues, verbessertes Verfahren ermittelt wird. Dazu wird versucht, möglichst geringfügige Veränderungen im Verfahrensablauf vorzunehmen, um dadurch die Fehlgüte **G** Schritt für Schritt zu verringern. Das Referenzbild wurde in allen Verlaufdiagrammen mit dem in Kapitel 6. beschriebenen Verfahren shadingkorrigiert. Die Lagekorrektur wurde manuell vorgenommen, da es sich während der Untersuchungen herausstellte, daß die manuelle Lagekorrektur der automatischen vorzuziehen ist. Dies wird auch in Kapitel 12.5.6. noch gezeigt werden.

12.5.1. Shadingkorrektur

Zunächst werden die zwei Shadingkorrekturvarianten untersucht, die in Kapitel 6.5. beschrieben wurden. Dabei wurde unterschieden ob für jedes zu untersuchende Bild ein eigenes Korrekturbild ermittelt werden soll, oder das Korrekturbild des zugehörigen Referenzbildes zur Berechnung der Shadingkorrektur herangezogen werden soll. Zum Vergleich wird auch die Fehlgüte angegeben, die sich ohne

Shadingkorrektur ergibt. Abbildung 12.1. zeigt dabei den Verlauf des Verfahrens, die Abbildungen 12.2. und 12.3. zeigen das Ergebnis.



Abbildung 12.1.: Ablauf beim Vergleich der Shadingkorrekturvarianten



Abbildung 12.2.: Fehlgüte G der Shadingkorrekturvarianten





Aus dieser Untersuchung geht hervor, daß bei den weiteren Verfahren für jedes zu untersuchende Bild ein eigenes Korrekturbild ermittelt werden muß, da hier die geringste Fehlgüte **G** (=29,53%) und der größte Rangkorrelationskoeffizient **r**_{S,B} (=0,117) ermittelt wurden. Dies wird in den folgenden Kapiteln kurz als 'Shadingkorrektur' bezeichnet.

12.5.2. Helligkeitsangleich vor der Subtraktion

Hier werden nun die Verfahren untersucht, die in Kapitel 7.2. beschrieben wurden. Es wurde zwischen einem additiven und einem multiplikativen Helligkeitsangleich unterschieden. Zum Vergleich wird auch hier die Fehlgüte angegeben, die sich ohne einen solchen Helligkeitsangleich ergibt. Abbildung 12.4. zeigt dabei den Verlauf des Verfahrens; die Abbildungen 12.5. und 12.6. zeigen das Ergebnis.



Abbildung 12.4.: Ablauf beim Vergleich der Varianten des Helligkeitsangleiches vor der Subtraktion



Abbildung 12.5.: Fehlgüte G der Varianten des Helligkeitsangleiches vor der Subtraktion



Abbildung 12.6.: Rangkorrelation r_{S,B} der Varianten des Helligkeitsangleiches vor der Subtraktion

Aus dieser Untersuchung geht hervor, daß bei den weiteren Verfahren der Helligkeitsangleich multiplikativ erfolgen muß, da hier die geringste Fehlgüte **G** (=24,46%) und der größte Rangkorrelationskoeffizient $\mathbf{r}_{S,B}$ (=0,451) ermittelt wurden. Dies wird in den folgenden Kapiteln kurz als 'Helligkeitsangleich' bezeichnet.

Die noch ausstehende Untersuchung des Parameters $K_{m,min}$ (siehe Kapitel 7.2.2.; Seite 73), der bisher zu Null gesetzt ist, wird im Anschluß an die gesamte Helligkeitsuntersuchung nachgeholt (Seite 107), da hierbei zuvor die Untersuchung eines Hochpaßes nützlich ist.

12.5.3. Helligkeitsangleich nach der Subtraktion

Dieses Kapitel untersucht die in Kapitel 10.2. beschriebenen Verfahren. Zusätzlich zu den drei Verfahren (Maximum, Mittelwert, Median) wird noch das Verfahren ohne einen Angleich in solch einer Art gerechnet. Jedes dieser vier Verfahren wird entweder mit einem Hochpaß mit $N_{H}=0$ oder einer Bandsperre mit $N_{B}=0$ berechnet (siehe Kapitel 10.2.4.), so daß man acht Ergebnisse erhält. Abbildung 12.7. zeigt dabei den Verlauf des Verfahrens; die Abbildungen 12.8. und 12.9. zeigen das Ergebnis.



Abbildung 12.7.: Ablauf beim Vergleich der Varianten des Helligkeitsangleiches nach der Subtraktion mit einem multiplikativen Helligkeitsangleich vor der Subtraktion



Abbildung 12.8.: Fehlgüte G der Varianten des Helligkeitsangleiches nach der Subtraktion mit einem multiplikativen Helligkeitsangleich vor der Subtraktion



Abbildung 12.9.: Rangkorrelation r_{S,B} der Varianten des Helligkeitsangleiches nach der Subtraktion mit einem multiplikativen Helligkeitsangleich vor der Subtraktion

Zum Vergleich sind in den Abbildungen 12.11. und 12.12. die entsprechenden Werte dargestellt, falls auf einen Helligkeitsangleich vor der Subtraktion verzichtet wurde (Ablaufdiagramm Abbildung 12.10.).



Abbildung 12.10.: Ablauf beim Vergleich der Varianten des Helligkeitsangleiches nach der Subtraktion ohne Helligkeitsangleich vor der Subtraktion



Abbildung 12.11.: Fehlgüte G der Varianten des Helligkeitsangleiches nach der Subtraktion ohne Helligkeitsangleich vor der Subtraktion



Abbildung 12.12.: Rangkorrelation r_{S,B} der Varianten des Helligkeitsangleiches nach der Subtraktion ohne Helligkeitsangleich vor der Subtraktion

Die geringste Fehlgüte **G** (=15,08%; Abb.12.8.) bzw. den größten Rangkorrelationskoeffizienten $\mathbf{r}_{S,B}$ (=0,729; Abb.12.9.) erkennt man bei einem multiplikativen Helligkeitsangleich vor der Subtraktion ohne Helligkeitsangleich nach der Subtraktion, aber mit Berechnung eines Hochpasses mit **N_H=0**. Dieser Wert **N_H** (siehe Seite 83) wird nun für diesen Fall im folgenden Schritt variiert und optimiert. Das Ergebnis zeigen die Abbildungen 12.13. und 12.14.. Dabei ist auch zu beachten, daß auf Grund der Definition von N_H die Fälle $N_H=0$ und $N_H=1$ identisch sind.



Abbildung 12.13.: Fehlgüte G bei Variation des Parameters N_H

Parameter N_H: Grauwertschranke beim Hochpaß (siehe Seite 83)



Abbildung 12.14.: Rangkorrelation r_{S,B} bei Variation des Parameters N_H Parameter N_H: Grauwertschranke beim Hochpaß (siehe Seite 83)

Aus der Abbildung kann man erkennen, daß sich für die Werte $N_{H}=2$ und $N_{H}=3$ die geringste Fehlgüte **G** von 14,70% einstellt. Um sich für einen Wert von N_{H} zu entscheiden, betrachtet man die Ergebnisse des Rangkorrelationskoeffizienten $r_{S,B}$, der bei $N_{H}=2$ ein Maximum ($r_{S,B}=0,730$) besitzt. Somit wird N_{H} auf den Wert 2 festgesetzt, das Bedeutet, daß alle Grauwerte < 2 aus dem Subtraktionsbild gelöscht, d.h. zu Null gesetzt werden.

Bisher wurde noch nicht der Parameter $K_{m,min}$ untersucht, der in Kapitel 7.2.2. (Seite 73) erklärt wurde. Nachdem jetzt der Helligkeitsangleich soweit festgelegt wurde, kann nun dieser Parameter $K_{m,min}$ abschließend untersucht werden. Bisher war er zu Null gesetzt worden, d.h. er hatte keinen Einfluß auf das Verfahren, da der Wert für den multiplikativen Helligkeitsangleich $M_{Ref,i}/M_i$ immer größer Null ist. Nun soll der Parameter $K_{m,min}$ im Bereich von 0 bis 1 variiert werden, und der optimale Wert gefunden werden. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 12.15. und 12.16. dargestellt.





Parameter K_{m.min}: minimaler multiplikativer Korrekturfaktor für den Helligkeitsangleich (siehe Seite 73)



Abbildung 12.16.: Rangkorrelation $r_{S,B}$ bei Variation des Parameters $K_{m,min}$

Parameter K_{m.min}: minimaler multiplikativer Korrekturfaktor für den Helligkeitsangleich (siehe Seite 73)

Man erkennt in beiden Abbildungen jeweils ein Extremwertplateau. Dabei ist das Minimum der Fehlgüte mit 13,18% im Bereich von 0,989 bis 0,996 für den Parameter $K_{m,min}$. Die Mitte dieses Plateaus liegt somit zwischen 0,992 und 0,993. Die Entscheidung hängt von dem entsprechenden Rangkorrelationskoeffizient $r_{S,B}$ ab. Dieser hat sein Maximum von 0,742 im Bereich von 0,990 bis 0,994 für den Parameter $K_{m,min}$. Hier ergibt sich eine eindeutige Mitte von 0,992, so daß dieser Wert als fester Wert für $K_{m,min}$ eingeführt wird.

12.5.4. Strukturelimination

Wie in Kapitel 10.3. (Seite 84) beschrieben, gilt es hier den Parameter **LG** (in %) (Prozentzahl) zu optimieren. Abbildung 12.17. zeigt dabei den Verlauf des Verfahrens; die Abbildungen 12.18. und 12.19. zeigen das Ergebnis.








Parameter LG: Längengrenzwert zur Optimierung der Strukturelimination (siehe Seite 84)





Parameter LG: Längengrenzwert zur Optimierung der Strukturelimination (siehe Seite 84)

Der Fehlgüte **G** zeigt ein minimales Plateau von 10,65% bei den Werten 79% und 80% für den Parameter **LG**. Ebenfalls erscheint für die Werte 75% und 82% ein Minimum. Berücksichtigt man dazu die Rangkorrelation $\mathbf{r}_{S,B}$ so erkennt man, daß diese bei einem Wert von 81% für **LG** ein Maximum von 0,820 besitzt. Für den Wert

80% ergibt sich ebenfalls eine sehr hohe Rangkorrelation $r_{S,B}$ von 0,819. Da die Rangkorrelation $r_{S,B}$ keine so große Aussagekraft bei solch hohen Werten besitzt, sollte man sich für den Wert 80% für den Parameter LG entscheiden, der damit sowohl der Fehlgüte G(=10,65%), als auch der Rangkorrelation $r_{S,B}(=0,819)$ gerecht wird.

12.5.5. Flächenelimination

Wie in Kapitel 10.6. beschrieben, gilt es hier den Parameter **F** (Flächengrenzwert; siehe Seite 87) zu optimieren. Abbildung 12.20. zeigt dabei den Verlauf des Verfahrens; die Abbildung 12.21. zeigt das Ergebnis. Auf eine weitere Berücksichtigung des Rangkorrelationskoeffizienten $\mathbf{r}_{S,B}$ wird nun wegen des hohen Wertes über 0,819 verzichtet.







Abbildung 12.21.: Fehlgüte G bei Variation des Parameters F

Parameter F: Flächengrenzwert zur Optimierung der Flächenelimination (siehe Seite 87)

Aus obiger Abbildung erkennt man ein deutliches minimales Plateau mit der Fehlgüte **G**=10,39% bei den Werten für die maximale Pixelanzahl **F** von 8 bis 14. Somit ergibt sich im Mittel für den Parameter **F** ein Wert von **11** bei einer Fehlgüte **G** von **10,39%**. Der sich dabei ergebende Wert für den Rangkorrelationskoeffizienten $\mathbf{r}_{S,B}$ beträgt **0,822**. Die Schranken $\mathbf{S}_0..\mathbf{S}_2$ (siehe Kapitel 12.2.) ergeben sich zu: \mathbf{S}_0 =0,473, \mathbf{S}_1 =0,595, \mathbf{S}_2 =0,766.

12.5.6. Lagekorrektur

Abschließend soll noch die Lagekorrektur diskutiert werden. Zur Auswahl standen dabei die manuelle Lagekorrektur und eine automatische Lagekorrektur nach einem Verfahren von Lenz [49]. Dabei wurde schon vorweggenommen, daß die manuelle Lagekorrektur effektiver ist als die automatische. Das Ablaufschema zeigt Abbildung 12.22.. Dies wird in den folgenden Abbildungen 12.23. und 12.24. bestätigt. Dabei wurde das oben ermittelte Verfahren ansonsten unverändert verwendet.







Abbildung 12.23.: Fehlgüte G bei Variation der Lagekorrektur



Abbildung 12.24.: Rangkorrelation r_{S,B} bei Variation der Lagekorrektur

Die manuelle Lagekorrektur zeigt eine deutlich geringere Fehlgüte **G** und eine ebenfalls deutlich höhere Rangkorrelation $\mathbf{r}_{S,B}$ und ist daher eindeutig zu bevorzugen.

12.5.7. Zusammenfassung

Zuletzt soll in diesem Kapitel der oben ermittelte und optimierte Programmablauf noch einmal dargestellt werden und die Wirkung auf die untersuchten Bilddaten anhand eines Beispiels mit und ohne Extravasation gezeigt werden. Außerdem wird die Entwicklung der Fehlgüte **G** und der Rangkorrelation **r**_{S,B} nach den verschiedenen Bearbeitungsschritten in den Abbildungen 12.26. und 12.27. zusammenfassend dargestellt. Auf die ermittelten Parameterwerte soll dabei nicht noch einmal eingegangen werden. In Abbildung 12.25. wird der ermittelte Ablauf noch einmal komplett dargestellt. Zusätzlich wurden die Positionen a) bis e) gekennzeichnet, die eine Zuordnung der Bilder 1a) bis 2e) ermöglichen. Die Bilder 1e) und 2e) stellen die ermittelten zugehörigen Shadingkorrekturfunktionen dar. Bild 1a) bis 1d) stellt ein Feld ohne Extravasation dar, Bild 2a) bis 2d) dagegen das selbe Feld zu späterem Zeitpunkt mit ausgeprägter Extravasation während corticaler Superfusion von 10⁻⁴ M Histamin. Als Tracer wurde FITC-Dextran 70000 in vivo infundiert. Die Zustände a) bis e) sind wie folgt zugeordnet:

- a) Originalbild nach 10-facher Mittelung
- b) nach der Shadingkorrektur
- c) nach der Subtraktion
- d) nach der Flächenelimination
- e) Shadingkorrekturbild

Die Bilder zeigen eine Fläche der Originalgröße von 6,125 mm * 4,05 mm. Damit die Bilder einigermaßen sinnvoll gedruckt werden konnten, wurden die einzelnen Bildpunkte mit einem Offset und einem Faktor folgendermaßen verrechnet:

dargestellter Grauwert = (Originalgrauwert - Offset) * Faktor

Ist dabei der berechnete Wert kleiner als Null, so wird er zu Null gesetzt. Entsprechend wird ein berechneter Wert größer als 255 zu 255 gesetzt. Für die Bilder a), b) und e) ist Offset = 63 und Faktor = 4, für die Bilder c) ist Offset = 94 und Faktor = 5 und für die Bilder d) ist Offset = 121 und Faktor = 9. Diese Werte wurden gewählt um die enthaltenen Grauwerte auf den maximal darstellbaren Grauwertbereich zu strecken.



Abbildung 12.25.: Optimierter Programmablauf

a)-e) bezeichnen die Positionen, an denen die unten gezeigten Bilder 1a)-1e) und 2a)-2e) genommen wurden.



Abbildung 12.26.: Entwicklung der Fehlgüte G



Abbildung 12.27.: Entwicklung des Rangkorrelationskoeffizienten r_{S,B}



Bild 1a): Original ohne Extravasation



Bild 1b): Nach Shadingkorrektur ohne Extravasation



Bild 1c): Nach Subtraktion ohne Extravasation



Bild 1d): Nach Flächenelimination ohne Extravasation



Bild 1e): Shadingkorrekturbild des Bildes ohne Extravasation



Bild 2a): Original mit Extravasation



Bild 2b): Nach Shadingkorrektur mit Extravasation



Bild 2c): Nach Subtraktion mit Extravasation



Bild 2d): Nach Flächenelimination mit Extravasation



Bild 2e): Shadingkorrekturbild des Bildes mit Extravasation

Wesentliche Aspekte der weiter- oder neu entwickelten Analyse der Bildverarbeitung sind in Findling et al. [35] publiziert worden. Nach der Publikation wurden jedoch noch einige Verbesserungen durchgeführt, die im folgenden diskutiert werden.

Durch die Einführung des Parameters LG (Längengrenzwert; siehe Seite 84) bei der Strukturelimination ergibt sich nun ein wesentlich geringerer Wert für den Parameter **F** (Flächengrenzwert; siehe Seite 87) als in Findling et al. [35] beschrieben, da sich der Wert von LG von 50% auf 80% erhöht hat. Dadurch nimmt das Verfahren der Strukturelimination einen größeren Einfluß auf die Bilddaten als bei Findling et al. [35], so daß das Verfahren der Flächenelimination nur noch auf kleinere Flächen Einfluß zu nehmen braucht. Zum Vergleich: Dort war der Parameter F mit 895 angegeben. Dieser vermeintlich hohe Wert kann somit durch einen sehr viel kleineren (durch 11) ersetzt werden. Weitere Unterschiede beim Vergleich von Findling et al. [35] mit dem hier vorgestellten Verfahren sind bei dem Parameter N_H (Grauwertschranke beim Hochpaß; siehe Seite 83) und dem Parameter $K_{m,min}$ (minimaler multiplikativer Korrekturfaktor für den Helligkeitsangleich; siehe Seite 73) zu erkennen. In Findling et al. [35] ist N_H mit 4 und K_{m.min} mit 0,993 beschrieben, während jetzt nach der Optimierung N_H mit 2 und K_{m.min} mit 0,992 angegeben werden können. Die Verringerung von N_H hat den Vorteil, daß weniger Bildinformation durch den Hochpaß gelöscht wird. Der Unterschied des Parameters $K_{m,min}$ hat dagegen kaum ein Einfluß auf die Güte des Verfahrens, wie die Abbildungen 12.15. und 12.16. auf den Seiten 107 f belegen. Die Unterschiede der zwei Verfahren sind in folgender Tabelle noch einmal zusammengefaßt:

	Verfahren nach Findling et al. [35]	hier vorgestelltes Verfahren
Parameter N_H	4	2
Parameter K _{m,min}	0,993	0,992
Parameter LG	50%	80%
Parameter F	895	11

Tabelle 12.1.: Vergleich des neuen Verfahrens mit dem Verfahren nach Findlinget al. [35]

Parameter N_H: Grauwertschranke beim Hochpaß (siehe Seite 83)

Parameter K_{m.min}: minimaler multiplikativer Korrekturfaktor für den Helligkeitsangleich (siehe Seite 73)

Parameter LG: Längengrenzwert zur Optimierung der Strukturelimination (siehe Seite 84)

Parameter F: Flächengrenzwert zur Optimierung der Flächenelimination (siehe Seite 87)

Das hier vorgestellte Verfahren unterscheidet sich darüberhinaus gravierend von dem in Bultmann et al. [14], Findling [33], Findling et al. [34] und Schilling et al. [78] benutzten und publizierten Verfahren in folgenden Punkten:

- Das jetzige Verfahren benutzt eine völlig andere Methode zur Shadingkorrektur.
- Der Helligkeitsangleich wurde neu entwickelt.
- Das Subtraktionsbild erfährt nun einen Offset (I_{offset}; siehe Seite 130), damit die negativen Werte bei der Subtraktion nicht zu Null gesetzt werden und damit ein möglicher Verlust an Informationsgehalt vermieden wird.
- Die Grauwertschranke beim Hochpaß N_H wurde von 6 auf 2 verkleinert. Das bedeutet, daß mehr Bildinformation vorhanden bleibt.
- Die Strukturelimination wurde durch Einführung des Längengrenzwertes LG optimiert. LG wurde so von 50% auf 80% erhöht.
- Die Flächenelimination ist neu hinzugekommen.

Im Unterschied zu Schilling et al. [78] wurden nicht 4 Bilder gemittelt, sondern wie auch schon in den Publikationen von Bultmann et al. [14], Findling [33] und Findling et al. [34] wurden bei der Digitalisierung 10 Bilder gemittelt.

In den folgenden Abbildungen 12.28. und 12.29. sind die Fehlgüte **F** bzw. der Rangkorrelationskoeffizient $\mathbf{r}_{S,B}$ zum Vergleich des Verfahrens nach Bultmann et al. [14], Findling [33] und Findling et al. [34] und des Verfahrens nach Findling et al. [35] mit dem hier vorgestellten optimierten Verfahren dargestellt. Dabei erhält man für das neue Verfahren die geringste Fehlgüte **F** und damit das beste Ergebnis. Das Verfahren nach Findling et al. [35] liefert zwar den höchsten Rangkorrelationskoeffizienten $\mathbf{r}_{S,B}$, jedoch ist bei dieser Größenordnung von $\mathbf{r}_{S,B}$ die Aussagekraft stark eingeschränkt (siehe Seite 96). Auf eine Auswertung dieser Art des Verfahrens nach Schilling et al. [78] wurde verzichtet, da alle Bilddaten 10-fach gemittelt vorlagen, und sich das Verfahren ansonsten nicht von dem Verfahren nach Bultmann et al. [14], Findling [33] und Findling et al. [34] unterscheidet.



Abbildung 12.28.: Fehlgüte G beim Vergleich von bereits veröffentlichten Verfahren

Verfahren 1: Verfahren, das von Bultmann et al. [14], Findling [33] und Findling et al. [34] benutzt und publiziert

wurde

Verfahren 2: Verfahren, das in Findling et al. [35] publiziert wurde

Verfahren 3: vorliegendes optimiertes Verfahren



Abbildung 12.29.: Rangkorrelationskoeffizient r_{S,B} beim Vergleich von bereits veröffentlichten Verfahren

Verfahren 1: Verfahren, das von Bultmann et al. [14], Findling [33] und Findling et al. [34] benutzt und publiziert

wurde

Verfahren 2: Verfahren, das in Findling et al. [35] publiziert wurde

Verfahren 3: vorliegendes optimiertes Verfahren

13. Verifikation der Methode

13.1. Allgemeines

In diesem Kapitel soll die neue Methode getestet und damit verifiziert werden. Dazu dienen Auswertungen von Bilddaten, die schon publiziert sind (Bultmann et al. [14], Findling et al. [34,35], Schilling et al. [78]). In diesen Publikationen waren jedoch ältere Verfahren der Bildauswertung zur Anwendung gekommen. In Schilling et al. [78] wurden die zugrund liegenden Bilddaten nur vierfach gemittelt.

Es soll gezeigt werden, daß unter Bedingungen, unter denen Extravasationen durch corticale Superfusion von hohen Nikotinkonzentrationen induziert wurden, tatsächlich ein Anstieg des El-Wertes (El-Wert siehe Seite 88) quantifiziert werden kann. Unter Kontrollbedingungen, bzw. unter Bedingungen, die Dilatationen aber keine Extravasationen zur Folge haben, kam es dagegen, wie in den folgenden Kapiteln gezeigt wird, nicht zu einem Anstieg des El-Wertes. Mit den letzteren Versuchen sollte geprüft werden, ob durch eine Dilatation tiefer gelegener Gefäße eine Zunahme des Backgrounds erfolgt, die eine Extravasation vortäuschen könnte. Alle folgenden Untersuchungen wurden bei intravenöser Applikation des Tracers FITC-Dextran 70000 durchgeführt.

13.2. Kontrollversuche

Ergebnisse aus Kontrollversuchen mit Superfusion von künstlichem inertem Liquor, bei denen es weder zu Extravasationen, noch zu Dilatationen kam, zeigen die folgenden Abbildungen 13.1. bis 13.4.



Abbildung 13.1.: El-Werte während Superfusion mit künstlichem inertem Liquor

n: Anzahl der untersuchten Felder

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

1', 15', 30' usw.: Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten usw. nach Superfusionsbeginn



Abbildung 13.2.: Durchmesseränderung von Piaarterien während Superfusion mit künstlichem inertem Liquor

n: Anzahl der untersuchten Felder

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

1', 15', 30' usw.: Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten usw. nach Superfusionsbeginn



Abbildung 13.3.: Durchmesseränderung von Piavenen während Superfusion mit künstlichem inertem Liquor

n: Anzahl der untersuchten Felder

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

1', 15', 30' usw.: Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten usw. nach Superfusionsbeginn



Abbildung 13.4.: Tracerkonzentration im Plasma während Superfusion mit künstlichem inertem Liquor

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

1', 15', 30' usw.: Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten usw. nach Superfusionsbeginn

Bei Superfusion von künstlichem inertem Liquor kann man weder einen Anstieg der EI-Werte, noch eine signifikante Änderung der Gefäßdurchmesser beobachten. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Schilling et al. [77,78], Schilling und Wahl [81], Unterberg et al. [89] und Wahl et al. [104] und zeigen, daß der Tracer unter obigen Kontrollbedingungen im intravasculären Raum bleibt und dadurch keine Extravasation im Beobachtungszeitraum zu beobachten ist. Nach Schilling und Wahl [81], Unterberg et al. [89] und Wahl et al. [104] ist dieser Zustand über drei Stunden stabil. Selbst bei einer kontinuierlichen Beleuchtung wäre bei dem verwendetem Tracer FITC-Dextran erst nach 90 Minuten eine Extravasation zu erwarten gewesen (nach Wahl et al. [104]). Auch die Beobachtung von Findling et al. [35], Schilling et al. [78] und Unterberg et al. [89] wird bestätigt, daß durch Superfusion von künstlichem Liquor keine Dilatation verursacht wird. Wie bei Schilling et al. [78] ist auch in den hier gezeigten Ergebnissen eine leichte Verminderung der Tracer-konzentration im Plasma zu beobachten, die hier jedoch nicht so stark ausgeprägt ist.

13.3. Hyperkapnie induzierte Dilatation

Um arteriolare Dilatationen auszulösen, ohne gleichzeitig Extravasationen zu induzieren, wurden Experimente durchgeführt, in denen für eine ca. zehnminütige

Phase eine moderate Hyperkapnie induziert wurde, da nach Cutler und Barlow [27], sowie nach Mayhan et al. [53] eine transiente Hyperkapnie die Blut-Hirnschranke weder für klein-, noch für großmolekulare Tracer öffnet. Die Hyperkapnie wurde durch eine Zugabe von 5 % CO₂ zu dem inspiratorischem Gasgemisch induziert. Dies bewirkt eine Dilatation der Piaarterien (Schneider et al. [82]) und der intraparenchymalen Arteriolen und Kapillaren (Atkinson et al. [4]). Während der Plateauphase der Hyperkapnie, sowie vorher und nachher unter Normokapniebedingungen wurden die definierten Areale aufgenommen. Der endexspiratorische CO₂-Wert während der Plateauphase der Hyperkapnie betrug 7,1 ± 0,4 vol%; während der Normokapnie vor und nach der Hyperkapnie betrug der CO₂-Wert 4,1 ± 0,1 vol%. Der Säure-Basen-Status im arteriellen Blut, das während der Plateauphase der Hyperkapnie entnommen wurde, war: pH, 7,30 ± 0,02; PCO₂, 5,9 ± 0,3 kPa (44,5 ± 2,5 mmHg); PO₂, 15,7 ± 2,4 kPa (118 ± 18 mmHg). Die Tracerkonzentration im Plasma wurde während der kurzen Plateauphase nicht gemessen. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Abbildungen 13.5. bis 13.7. dargestellt.



Abbildung 13.5.: El-Werte bei Hyperkapnie

n: Anzahl der untersuchten Felder

Normokapnie I: Aufnahmen unter Paraffinöl vor Hyperkapnie; arterieller PCO2: 3,7 ± 0,6 kPa (27,7 ± 4,3 mmHg)

Hyperkapnie: arterieller PCO2: 5,9 ± 0,3 kPa (44,5 ± 2,5 mmHg)

Normokapnie II: Aufnahmen nach einminütiger Superfusion von CSF nach Hyperkapnie

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)



Abbildung 13.6.: Durchmesseränderung von Piaarterien bei Hyperkapnie

n: Anzahl der untersuchten Felder

Normokapnie I: Aufnahmen unter Paraffinöl vor Hyperkapnie; arterieller PCO2: 3,7 ± 0,6 kPa (27,7 ± 4,3 mmHg)

Hyperkapnie: arterieller PCO2: 5,9 ± 0,3 kPa (44,5 ± 2,5 mmHg)

Normokapnie II: Aufnahmen nach einminütiger Superfusion von CSF nach Hyperkapnie

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

p: Signifikanzlevel gegenüber Normokapnie I



Abbildung 13.7.: Durchmesseränderung von Piavenen bei Hyperkapnie

n: Anzahl der untersuchten Felder

Normokapnie I: Aufnahmen unter Paraffinöl vor Hyperkapnie; arterieller PCO2: 3,7 ± 0,6 kPa (27,7 ± 4,3 mmHg) Hyperkapnie: arterieller PCO2: 5,9 ± 0,3 kPa (44,5 ± 2,5 mmHg) Normokapnie II: Aufnahmen nach einminütiger Superfusion von CSF nach Hyperkapnie CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

eingezeichnet sind Mittelwerte ± SEM

Man kann hier eine signifikante Dilatation der Piaarterien beobachten, während die Piavenen keine signifikante Änderung des Gefäßdurchmessers zeigen. Ein Anstieg des Extravasationsgrades ist nicht zu beobachten, das heißt, daß Dilatationen tiefer gelegener Gefäße, die die Backgroundintensität verändern könnten, keinen Einfluß auf den Ef-Wert haben, wie auch von Findling et al. [35] beschrieben und von Bultmann et al. [14] bestätigt wird.

13.4. Nikotin induzierte Extravasation

Um Extravasationen ohne begleitende Dilatationen zu induzieren, wurde Nikotin in hoher Konzentration (10⁻⁴ und 10⁻³ M) jeweils über eine halbe Stunde superfundiert. Wie schon bei Schilling et al. [78] detailliert beschrieben und diskutiert wurde, erfolgt die Tracerextravasation in den extravasculären Raum vornehmlich im Bereich der Venen. Die Mechanismen zur Offnung der Blut-Hirnschranke durch diese toxischen Konzentrationen von Nikotin sind nicht bekannt. In Frage kommen entweder ein direkter Effekt des Nikotins auf das vaskuläre Endothel oder die Freisetzung von Autacoiden, die ihrereseits die Gefäßpermeabilität erhöhen. Die Untersuchungsergebnisse sind in den Abbildungen 13.8. bis 13.11. dargestellt.



Abbildung 13.8.: El-Werte bei Nikotin-Superfusion

n: Anzahl der untersuchten Felder

p: Signifikanzlevel gegenüber Werte der Referenzaufnahmen

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

Nic-4, Nic-3: Superfusion von 10⁻⁴ bzw. 10⁻³ M Nikotin

1', 15', 30': Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten nach Superfusionsbeginn



Abbildung 13.9.: Durchmesseränderung von Piaarterien bei Nikotin-Superfusion

n: Anzahl der untersuchten Felder

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

Nic-4, Nic-3: Superfusion von 10⁻⁴ bzw. 10⁻³ M Nikotin

1', 15', 30': Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten nach Superfusionsbeginn



Abbildung 13.10.: Durchmesseränderung von Piavenen bei Nikotin-Superfusion

n: Anzahl der untersuchten Felder

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

Nic-4, Nic-3: Superfusion von 10⁻⁴ bzw. 10⁻³ M Nikotin

1', 15', 30': Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten nach Superfusionsbeginn



Abbildung 13.11.: Tracerkonzentration im Plasma bei Nikotin-Superfusion

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor) Nic-4, Nic-3: Superfusion von 10⁻⁴ bzw. 10⁻³ M Nikotin

1', 15', 30': Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten nach Superfusionsbeginn

Die Abbildungen zeigen, daß eine signifikante Erhöhung der EI-Werte nicht durch Dilatationen der Gefäße, sondern durch Extravasationen bedingt ist. Die Tatsache, daß hier bei corticaler Superfusion eine Dilatation der Piaarterien nicht nachgewiesen werden konnte, steht im Gegensatz zu früheren Befunden von Wahl und Kuschinsky [99]. Diese Autoren beschrieben signifikante Dilatationen von 5% bzw. 23% bei 40 Sekunden andauernder perivasculärer Mikroapplikation (5µl) von 10⁻⁴ und 10⁻³ M Nikotin. Wie schon bei Schilling et al. [78] diskutiert wird, könnte die fehlende Arteriolendilatation bei corticaler Superfusion von 10⁻⁴ und 10⁻³ M Nikotin mit einem längeren Diffussionsweg, mit einer Vermischung mit natürlichen Liquor oder mit einer Freisetzung von Substanzen aus Parenchymzellen, die dem dilatierenden Effekt von Nikotin entgegenwirken, erklärt werden.
13.5. Adenosin induzierte Extravasation und Dilatation

In den Abbildungen 13.12. bis 13.15. sind Ergebnisse aus Versuchen gezeigt, bei denen Adenosin in Konzentrationen von 10⁻⁵, 10⁻⁴ und 10⁻³ M für jeweils 30 Minuten superfundiert wurde. Diese Superfusion führt, wie auch bei Findling et al. [35] beschrieben und diskutiert wurde, sowohl zu einer Extravasation als auch zu einer Dilatation der Gefäße ab einer Konzentration von 10⁻⁴ M Adenosin.



Abbildung 13.12.: El-Werte bei Adenosin-Superfusion

n: Anzahl der untersuchten Felder

p: Signifikanzlevel gegenüber Werte der Referenzaufnahmen

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

AR-5, AR-4, AR-3: Superfusion von 10⁻⁵, 10⁻⁴ bzw. 10⁻³ M Adenosin

1', 15', 30': Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten nach Superfusionsbeginn

eingezeichnet sind Mittelwerte ± SEM



Abbildung 13.13.: Durchmesseränderung von Piaarterien bei Adenosin-Superfusion

n: Anzahl der untersuchten Felder

p: Signifikanzlevel gegenüber Werte der Referenzaufnahmen

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

AR-5, AR-4, AR-3: Superfusion von 10⁻⁵, 10⁻⁴ bzw. 10⁻³ M Adenosin

1', 15', 30': Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten nach Superfusionsbeginn

eingezeichnet sind Mittelwerte ± SEM



Abbildung 13.14.: Durchmesseränderung von Piavenen bei Adenosin-Superfusion

n: Anzahl der untersuchten Felder

p: Signifikanzlevel gegenüber Werte der Referenzaufnahmen

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor)

AR-5, AR-4, AR-3: Superfusion von 10⁻⁵, 10⁻⁴ bzw. 10⁻³ M Adenosin

1', 15', 30': Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten nach Superfusionsbeginn

eingezeichnet sind Mittelwerte ± SEM



Abbildung 13.15.: Tracerkonzentration im Plasma bei Adenosin-Superfusion

CSF: Cerebrospinalflüssigkeit (künstlicher inerter Liquor) AR-5, AR-4, AR-3: Superfusion von 10⁻⁵, 10⁻⁴ bzw. 10⁻³ M Adenosin 1', 15', 30': Messung eine Minute, 15 bzw. 30 Minuten nach Superfusionsbeginn

Diese Experimente mit Applikation von Adenosin waren ursprünglich geplant, um zu demonstrieren, daß eine Dilatation von Piaarterien den El-Wert nicht verändert und somit eine Extravasation nicht vortäuscht. Diese Hypothese basierte auf Befunden von Wahl und Kuschinsky [97], die die konzentrationsabhängige dilatierende Wirkung von Adenosin an Piaarterien der Katze gezeigt haben, während Mayhan et al. [53] keine Tracerextravasation während 30-minütiger kortikaler Superfusion mit 10⁻⁴ M Adenosin bei Ratten fanden. Somit wurde von uns vor Beginn der Versuche Adenosin als Dilatator ohne Wirkung auf die Blut-Hirnschranke eingestuft. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, daß diese Hypothese falsch ist. Überraschenderweise stellte sich heraus, daß Adenosin in unserem Versuchsmodell nicht nur die Arteriolen dilatierte, sondern auch eine Offnung der Blut-Hirnschranke bewirkte. Die hier gezeigte dilatierende Wirkung von Adenosin während corticaler Superfusion stimmt qualitativ mit früheren Befunden von Wahl und Kuschinsky [97] bei perivasculärer Mikroapplikation von Adenosin überein. Die geringere vasomotorische Wirkung in unseren Versuchen könnte auf einer Barrierenfunktion der Pia- und Arachnoideamembranen, einer längeren Diffusionsstrecke und einer Verdünnung durch natürlichen Liquor beruhen, was man bei corticaler Superfusion berücksichtigen muß. Die hier gezeigte extravasationsinduzierende Wirkung von 10-4 und 10⁻³ M Adenosin wurde noch durch zusätzliche Experimente mit 15-minütiger

Applikationsdauer erhärtet, in denen es ebenfalls zur Tracerextravasation kam (Findling et al. [35]). Eine permeabilitätssteigernde Wirkung von Adenosin wurde auch von Gawlowski und Durán [38] und Murray et al. [58] für Gefäße der Hamsterbackentasche nachgewiesen.

Im Vergleich zu Findling et al. [35] kann mit dem vorliegenden Analyseverfahren auch eine Siginfikanz des Anstiegs des El-Wertes nach einminütiger Superfusion von 10⁻⁴ M Adenosin festgestellt werden. Das bedeutet, daß das Verfahren im Vergleich zu Findling et al. [35] noch etwas sensibler gestaltet wurde.

13.6. Zusammenfassung der tierexperimentell gewonnenen Ergebnisse

Zunächst konnte durch corticale Superfusion von künstlichem inertem Liquor nachgewiesen werden, daß die hier neu entwickelte Methode zur Erkennung von Extravasationsarealen unter Kontrollbedingungen keinen fälschlichen Anstieg der El-Werte verzeichnet und damit keine falsch positiven Werte berechnet.

Die Induktion einer Hyperkapnie verursacht eine Dilatation von Gefäßen (Schneider et al. [82], Atkinson et al. [4]), ohne daß sich die Blut-Hirnschranke für Tracer mit einem Molekulargewicht im Bereich von 67000 bis 70000 Dalton öffnet (Cutler und Barlow [27], Mayhan et al. [53]). Diese Untersuchungen dienten daher zur Überprüfung, ob das neue Verfahren einen Anstieg der El-Werte verzeichnet, wenn sich durch Dilatation der oberflächlichen und tiefen Gefäße der Background ändert, ohne daß Extravasationen vorliegen. Auch hier zeigte das neue Verfahren keine falsch positiven Ergebnisse, so daß auch für diesen Fall das neue Verfahren korrekte Ergebnisse liefert.

Als dritten Nachweis für die Funktionalität des neuen Verfahrens wurden Extravasationen induziert, ohne daß Dilatationen auftreten. Dazu wurde Nikotin in hoher Konzentration (10⁻⁴ M, 10⁻³ M) superfundiert. Hier lieferte das neue Verfahren kontinuierlich ansteigende EI-Werte mit einem signifikanten Anstieg ab einer 30minütigen Superfusion von 10⁻⁴ M Nikotin. Da bei dem von Bultmann et al. [14] verwendeten Auswertungsverfahren für die gleichen Versuche eine signifikante Extravasation erst nach etwa 15-minütiger Superfusion von 10⁻³ M Nikotin nachzuweisen war, kann man folgern, daß das neue Verfahren sensitiver geworden ist und mit diesen Bilddaten bessere Ergebnisse erzielt. Schließlich konnte durch die Superfusion von 10⁻⁵ M Adenosin über eine Dauer von 30 Minuten nachgewiesen werden, daß durch geringe Dilatationen oberflächlicher Gefäße der EI-Wert nicht fälschlicherweise ansteigt.

Die Ergebnisse, die bei Adenosinkonzentrationen von 10⁻⁴ und 10⁻³ M gewonnen wurden, sind für die methodische Analyse, ob das hier verwendete Verfahren nur 'echte' Extravasationen erfaßt und nicht durch Dilatationen von Gefäßen oder Backgroundveränderungen gestört wird, nur bedingt verwendbar, da synchron Dilatationen und Extravasationen auftraten. Allerdings kann man die Durchführung dieser Experimente zur methodischen Analyse verstehen, wenn man bedenkt, daß wir von der Hypothese ausgegangen waren, daß Adenosin bei corticaler Superfusion nur eine Dilatation der Piaarterien hervorrufen würde und somit eine Möglichkeit eröffnet hätte, zu zeigen, daß alleine Dilatation oberflächlicher Gefäße den El-Wert nicht beeinflußt. Nach Durchführung der Experimente erwies sich allerdings unsere 'Adenosinhypothese' als falsch. Allerdings zeigen diese Ergebnisse einen steileren Anstieg des El-Wertes, als unter Nikotinsuperfusion, bei der es dabei zu einer Extravasation ohne begleitende Vasodilatation kam. Der steilere Anstieg der El-Werte unter Adenosinsuperfusion könnte ein Indiz dafür sein, daß eine arterioläre Vasodilatation und die damit einhergehende Zunahme des intravaskulären Drucks die Tracerextravasation bei erhöhter Gefäßpermeabilität verstärken kann.

Diese Beispiele machen deutlich, daß die neu entwickelte Methode zur Erkennung von Extravasationsarealen eingesetzt werden kann und sensitiver ist als die früher von uns verwendeten Auswerteverfahren. Die Plasmaintensität sollte einigermaßen konstant gehalten werden, obwohl kleinere Abweichungen von dieser neuen Methode durch den multiplikativen Helligkeitsangleich kompensiert werden können. Dilatationen von Gefäßen haben auf die Ergebnisse der neuen Methode keine Auswirkungen, so daß diese Methode wirkungsvoll zur Erkennung von 'echter' Extravasation eingesetzt werden kann.

14. Zusammenfassung

Die Blut-Hirnschranke (BHS), deren morphologisches Substrat das kontinuierliche Endothel mit 'tight junctions' darstellt, hat funktionell die Eigenschaften eines dichten Epithels. Mit Hilfe spezifischer Transportsysteme ist ein selektiver Austausch zwischen Blut und Gehirn möglich, so daß die Homöostase des Gehirnmilieus erhalten bleibt. Unter pathologischen Bedingungen (z. B. Hirntrauma) kann die BHS geöffnet, ein vasogenes Ödem gebildet und die Homöostase gestört werden.

Ziel der Arbeit war es, die mit fluoreszierenden Tracern und intravitaler Fluoreszenzmikroskopie zu beobachtende Steigerung der Durchlässigkeit der BHS mittels digitaler Bildverarbeitung zu quantifizieren. Das Prinzip der Methode beruht darauf, durch Bildsubtraktion den Gefäßbaum der extraparenchymalen Gefäße mit den fluoreszierenden Tracern und dem Background aus den Aufnahmen der Hirnoberfläche zu eliminieren, so daß bei Offnung der BHS im Subtraktionsbild nur Extravasationsareale zu sehen sind, deren Fläche und Intensität densitometrisch erfaßt werden können. Auch wenn entsprechende Verfahren für periphere, transparente Organe schon publiziert sind, mußten hirnspezifische Probleme wie Auflichtmikroskopie, Background, respiratorische und pulsatorische Schwankungen des Gehirns, sowie bei größeren Arealen inhomogene Verteilung des Lichtes zur Anregung der Tracer berücksichtigt werden. Aufbauend auf einem im Labor entwickelten Verfahren (Schilling et al. [78]) mußten im wesentlichen alle Bildverarbeitungsschritte optimiert und überarbeitet werden. Außerdem mußten alternative Methoden gefunden werden, die miteinander zu vergleichen waren. Darüberhinaus mußten methodisch apparative Fragen geklärt werden, und es galt, neue verbesserte Hardware zu installieren und optimal einzusetzen.

Im folgenden werden Vorgehen und Ergebnisse dargestellt:

Bei der Digitalisierung der analogen Bilddaten wurde zur Rauschminderung die Anzahl der Mittelungen erhöht. Darüberhinaus wurde eine Automation eingeführt, die es dem Computer ermöglicht, den Digitalisierungsprozeß aller anfallenden analogen Quellbilder ohne manuellen Eingriff selbst auszuführen.

In Voruntersuchungen wurde die Stabilität des Anregungslichtes nachgewiesen und es wurde herausgefunden, daß das Fading des fluoreszierenden Tracers für diese Versuchsanordnung keine Rolle spielt.

Aufgrund der Inhomogenität der räumlichen Verteilung der Lichtintensitäten mußte ein neues Verfahren einer Shadingkorrektur ermittelt werden, da das frühere Verfahren Schwächen aufwies. Dazu wurden vier Varianten neu entwickelt und diese gegeneinander und gegen das alte Verfahren getestet. Es wurde ein Gütevergleich der Verfahren entwickelt und durchgeführt, der eine objektive Beurteilung der Qualität der Verfahren zur Shadingkorrektur erlaubt. Es stellte sich heraus, daß ein Verfahren, das ein shadingkorrigiertes Bild aus dem Testbild alleine berechnet, und das auf spezielle Tiefpaßalgorithmen aufgebaut ist, am besten geeignet ist.

Es zeigten sich in einigen Versuchen ohne Extravasation Schwankungen der mittleren Bildhelligkeit, die möglicherweise auf geringe Inkonstanzen der Tracerkonzentration zurückgeführt werden können. Um dieses Problem zu lösen, wurden verschiedene Algorithmen zum Helligkeitsangleich gegeneinander getestet, die auf multiplikativen oder additiven Helligkeitsangleich vor der Subtraktion aufbauen und durch drei Modifikationen nach der Bildsubtraktion unterstützt werden. Bei einem abschließenden Gütevergleich stellte sich ein multiplikativer Helligkeitsangleich vor der Bildsubtraktion mit einem optimierten Hochpaß nach der Subtraktion als optimales Verfahren zur Lösung des oben geschilderten Problems heraus.

Die oben bereits erwähnten respiratorischen und pulsatorischen Schwankungen der Hirnoberfläche mußten durch ein geeignetes Lagekorrekturprogramm kompensiert werden, damit die Bilder, die voneinander subtrahiert werden müssen, lagegleich zueinander sind. Dazu wurde ein automatisches Verfahren von Lenz [49] mit einem selbst entwickelten, verbesserten manuellem Verfahren verglichen. Das manuelle Verfahren lieferte dabei zuverlässigere und damit geeignetere Daten und wurde als Lagekorrekturverfahren in das Bildverarbeitungsprogramm integriert.

Das bisher bestehende Verfahren der Strukturelimination wurde durch Optimierung verbessert. Außerdem wurde abschließend zur Artefaktminimierung eine Flächenelimination eingeführt.

Alle diese Verarbeitungsprogramme wurden schrittweise zusammengesetzt und verglichen, und mit Hilfe zweier Programme, die einen Gütevergleich der verschiedenen zu einem Programm zusammengesetzten Varianten ermöglichen, wurden alle Parameter optimiert. Eines dieser Programme zum Gütevergleich berechnet den Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (siehe Sachs [76]), das zweite, selbst entwickelte Programm beruht auf einer Einteilung der Ergebnisse in Klassen. Beide zeigten große Übereinstimmung in den Ergebnissen, mit letzterem jedoch konnte eine noch exaktere Bestimmung der Parameter erzielt werden. Daraus resultierte ein optimiertes neues Verfahren zur digitalen Bildauswertung. Ein quantitativer Vergleich mit dem im Labor schon vorhandenen Verfahren (Schilling et al. [78]) ergab eine deutliche Verbesserung durch das hier vorgestellte Verfahren.

Mit Hilfe des neuen Verfahrens zur Bildverarbeitung wurden verschiedene Versuchsserien mit definierten Bedingungen und Ergebnissen analysiert. So zeigte sich unter Kontrollbedingungen (ohne Extravasation oder vasomotorische Reaktionen), daß die BHS in den hier gewählten Versuchsperioden intakt war. Hyperkapnie induziert eine Dilatation der oberflächlich und tief gelegenen Arteriolen ohne Extravasation bzw. Öffnung der Blut-Hirnschranke. Dies zeigt, daß ausschließlich Backgroundveränderungen, die bei einer CO₂-bedingten Dilatation tiefer gelegener Arteriolen auftreten können, bei dem hier vorgestellten Analyseverfahren nicht zur fälschlichen Anzeige von Extravasationen führt. Die durch Superfusion von Adenosin (10⁻⁵ M) hervorgerufene alleinige Dilatation oberflächlicher Arteriolen bewirkt ebenfalls keinen fälschlichen Anstieg des Extravasationsindex. Erst bei höheren Adenosinkonzentrationen, die zu Extravasation und weiterer Dilatation führen, steigt der Index an. Durch Superfusion von Nikotin (10⁻⁴ M, 10⁻³ M) wurden Extravasationen ohne begleitende Gefäßdilatationen induziert. Hier zeigte das neue Verfahren einen Anstieg der Meßergebnisse und reagierte damit sensibel auf ein Anstieg der Extravasationen.

Mit diesen Versuchsserien konnte gezeigt werden, daß das neue Verfahren der digitalen Bildverarbeitung eine quantitative Bestimmung der Extravasationen von fluoreszierenden Tracern in vivo erlaubt, ohne daß vasomotorische Reaktionen oder Veränderungen des Backgrounds dieses Meßergebnis verfälschen.

15. Literaturverzeichnis

- [1] Abbott NJ, Revest PA: Control of brain endothelial permeability; Cerebrovasc Brain Metab Rev 3:39-72, 1991.
- [2] Aggarwal SJ, Shah SJ, Diller KR, Baxter CR: Fluorescence digital microscopy of interstitial macromolecular diffusion in burn injury; Comput Biol Med 19:245-262, 1989.
- [3] Armenante PM, Kim D, Durán WN: Experimental determination of the linear correlation between in vivo TV fluorescence intensity and vascular and tissue FITC-DX concentrations; Microvasc Res 42:198-208, 1991.
- [4] Atkinson JLD, Anderson RE, Sundt TM: The effect of carbon dioxide on the diameter of brain capillaries; Brain Res 517:333-340, 1990.
- [5] Bekker AY, Ritter AB, Durán WN: Analysis of microvascular permeability to macromolecules by video-image digital processing; Microvasc Res 38:200-216, 1989.
- [6] Bertler A, Falck B, Owman C, Rosengreen E: The localization of monoaminergic machanisms; Pharmacol Rev 18:369-385, 1966.
- [7] Betz AL, Firth JA, Goldstein GW: Polarity of the Blood-Brain Barrier: Distribution of Enzymes between the Luminal and Antiluminal Membranes of Brain Capillary Endothelial Cells; Brain Res 192:17-28, 1980.
- [8] Betz AL, Goldstein GW: Specialized properties and solute transport in brain capillaries; Annu Rev Physiol 48:241-250, 1991.
- [9] Black KL, Baba T, Pardridge WM: Enzymatic barrier protects brain capillaries from leukotriene C_4 ; J Neurosurg 81:745-751, 1994.
- [10] Bradbury MWB: The structure and function of the blood-brain barrier; Federation Proc 43:186-190, 1984.
- [11] Bradbury MWB: The blood-brain barrier transport across the cerebral endothelium; Circ Res 57:213-222, 1985.
- [12] Bradbury S: Microscopical image analysis: problems and approaches; J Microscopy 115:137-150, 1978.

- [13] Brightman MW, Reese TS: Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain; J Cell Biol 40:648-677, 1969.
- [14] Bultmann A, Schilling L, Findling A, Wahl M: Investigation of blood-brain barrier permeability by means of computerized image analysis; Vasa 23:195-204, 1994.
- [15] Bundgaard M: Transport pathways in capillaries in search of pores; Am Rev Physiol 43:325-336, 1980.
- [16] Butt AM, Jones HC, Abbott NJ: Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study; J Physiol 429:47-62, 1990.
- [17] Butt AM, Jones MC: Effect of histamine and antagonists on electrical resistance across the blood-brain barrier in rat brain-surface microvessels; Brain Res 569:100-105, 1992.
- [18] Castelmann KR: Digital Image Processing; Prentice Hall, New Jersey, 1979.
- [19] Cordon-Cardo C, O'Brien J, Casals D, Rittman-Grauer L, Biedler JL, Melamed MR, Bertino JR: Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites; Proc Natl Acad Sci USA 86:695-698, 1989.
- [20] Cornford EM: The blood-brain barrier, a dynamic regulatory interface; Mol Physiol 7:219-260, 1985.
- [21] Crone C: Facilitated transport of glucose from blood into brain; J Physiol 181:103-113, 1965.
- [22] Crone C, Olesen SP: Electrical resistance of brain microvascular endothelium; Brain Res 241:49-55, 1982.
- [23] Crone C: Modulation of solute permeability in microvascular endothelium; Federation Proc 45:77-83, 1986.
- [24] Crone C: The blood-brain barrier: a modified tight epithelium; In: Suckling AJ, Rumsby MG, Bradbury MWB (eds): The blood-brain barrier in health and disease; Chichester; Ellis Horwood pp 17-40, 1986.

- [25] Crone C: The blood-brain barrier as a tight epithelium: where is information lacking?; In: The neuronal microenviroment; Ann NY Acad Sci 481:174-185, 1987.
- [26] Curry FE, Joyner WL, Rutledge JC: Graded modulation of frog microvessel permeability to albumin using ionophore A23187; Amer J Physiol 258:H587-H598, 1990.
- [27] Cutler RWP, Barlow CF: The effect of hypercapnia on brain permeability to protein; Arch Neurol 14:54-63, 1966.
- [28] Davson H: The blood-brain barrier; J Physiol 255:1-28, 1976.
- [29] Easton AS, Fraser PA: Variable restriction of albumin diffusion across inflamed cerebral microvessels of the anaesthetized rat; J Physiol 475:147-157, 1994.
- [30] Eggert HR, Blazek V: Optical properties of human brain tissue, meninges and brain tumors in the spectral range of 200 to 900 nm; Neurosurgery 21:459-464, 1987.
- [31] Ehrlich P: Das Sauerstoff Bedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie; Hirschwald, Berlin, 1885.
- [32] Faraci FM, Choi J, Baumbach GL, Mayhan WG, Heistad DD: Microcirculation of the area postrema - permeability and vascular response; Circ Res 65:417-425, 1989.
- [33] Findling A: Entwicklung eines rechnergestützten Verfahrens zur Mustererkennung in einem biologischen Präparat mit Mitteln der digitalen Bildverarbeitung; Diplomarbeit am Lehrstuhl für Nachrichtentechnik der Technischen Universität München, 1991.
- [34] Findling A, Bultmann A, Schilling L, Wahl M: A new method using computerized image analysis for the study of blood-brain barrier permeability in vivo; Pflügers Arch 422, Suppl. 1: R110, 1993.
- [35] Findling A, Schilling L, Bultmann A, Wahl M: Computerised image analysis in conjunction with fluorescence microscopy for the study of blood-brain barrier permeability in vivo; Pflügers Arch 427:86-95, 1994.
- [36] Fraser PA, Dallas AD: Measurement of filtration coefficient in single cerebral microvessels of the frog; J Physiol 423:343-361, 1990.

- [37] Gahm Th, Reinhardt ER, Witte S: Analysis of the wall permeability of blood vessels in the rat mesentery; Res Exp Med 184:1-15, 1984.
- [38] Gawlowski DM, Durán WN: Dose-related effects of adenosine and bradykinin on microvascular permselectivity to macromolecules in the hamster cheek pouch; Circ Res 58:348-355, 1986.
- [39] Goldstein GW, Betz AL: The blood-brain barrier; Sci Amer 254:74-83, 1986.
- [40] Gonzales RC, Wintz P: Digital image processing, Second Edition; Reading, Massachusetts; Addison-Wesley Publishing Company, 1987.
- [41] Gross PM: Circumventricular organ capillaries; In: Ermisch A, Landgraf R, Rühle HJ (eds): Progress in brain research; Amsterdam; Elsevier Science Publ pp 219-233, 1992.
- [42] Grünwald F, Schröck H, Kuschinsky W: The effect of an acute nicotine infusion on the local cerebral glucose utilization of the awake rat; Brain Res 400:232-238, 1987.
- [43] Grünwald F, Schröck H, Theilen H, Biber A, Kuschinsky W: Local cerebral utilization of the awake rat during chronic administration of nicotine; Brain Res 456:350-356, 1988.
- [44] Haberäcker P: Digitale Bildverarbeitung: Grundlagen und Anwendungen,3. Auflage; München, Wien; Hanser, 1989.
- [45] Hertz MM, Bolwig TG: Blood-brain barrier studies in the rat: An indicator dilution technique with tracer sodium as an internal standard for estimation of extracerebral contamination; Brain Res 107:333-334, 1976.
- [46] Hertz MM. Paulson OB: Heterogeneity of cerebral capillary flow in man and its consequences for estimation of blood-brain barrier permeability; J Clin Invest 65:1145-1151, 1981.
- [47] Hultström D: FITC-dextrans in neurobiological research; Uppsala; Acta Universitatis Upsaliensis, 1982.
- [48] Klatzo I: Neuropathological aspects of brain edema; J Neuropathol Exp Neurol 26:1-14, 1967.

- [49] Lenz R: Ein Verfahren zur Schätzung der Parameter geometrischer Bildtransformationen, Nachrichtentechnische Berichte Band 15; München; Schriftenreihe des Lehrstuhls für Nachrichtentechnik der Technischen Universität München, 1986.
- [50] Ley K, Arfors K-E: Segmental differences of microvascular permeability for FITC-dextrans measured in the hamster cheek pouch; Microvasc Res 31:84-99, 1986.
- [51] Martins AN, Doyle TF, Wright SJ Jr, Bass BG: Response of cerebral circulation to topical histamine; Stroke 11:469-476, 1980.
- [52] Mayhan WG, Heistad DD: Permeability of blood-brain barrier to various sized molecules; Amer J Physiol 248:H712-H718, 1985.
- [53] Mayhan WG, Faraci FM, Heistad DD: Effects of vasodilatation and acidosis on the blood-brain barrier; Microvasc Res 35:179-192, 1988.
- [54] Mayhan WG, Faraci FM, Siems JL, Heistad DD: Role of molecular charge in disruption of the blood-brain barrier during acute hypertension; Circ Res 64:658-664, 1989.
- [55] McEachron DL, Gallistel CR, Eilbert JL, Tretiak OJ: The analytic and functional accuracy of a video densitometry system; J Neurosci Meth 25:63-74, 1988.
- [56] Mize RR, Holdefer RN, Nabors LB: Quantitative immunocytochemistry using an image analyzer - I. Hardware evaluation, image processing, and data analysis; J Neurosci Meth 26:1-24, 1988.
- [57] Mooradian AD, Grabau G, Bastani B: Adenosine Triphosphatases of Rat Cerebral Microvessels. Effect of Age and Diabetes Mellitus; Life Sci 55:1261-1265, 1994.
- [58] Murray MA, Heistad DD, Mayhan WG: Role of protein kinase C in bradykinininduced increases in microvascular permeability; Circ Res 68:1340-1348, 1991.
- [59] Nugent LJ, Jain RK: Plasma pharmacokinetics and interstitial diffusion of macromolecules in a capillary bed; Amer J Physiol 246:H129-H137, 1984.
- [60] Oldendorf WH: Stereospecificity of blood-brain barrier permeability to amino acids; Amer J Physiol 224:967-969, 1973.

- [61] Oldendorf WH: Blood-brain barrier permeability to drugs; Annu Rev Pharmacol 14:239-248, 1974.
- [62] Oldendorf WH, Szabo J: Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers; Amer J Physiol 230:94-98, 1976.
- [63] Olesen SP, Crone C: Substances that rapidly augment ionic conductance of endothelium in cerebral venoles; Acta Physiol Scand 127:233-241, 1986.
- [64] Olesen SP: Free oxygen radicals decrease electrical resistance of microvascular endothelium in brain; Acta Physiol Scand 129:181-187, 1987.
- [65] Pardridge WM: Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier; Physiol Rev 63:1481-1535, 1983.
- [66] Pratt WK: Digital Image Processing; Wiley, New York, 1978.
- [67] Raichle ME: Quantitative in vivo autoradiography with positron emission tomography; Brain Res Rev 1:47-68, 1979.
- [68] Rapoport SI: Blood-brain barrier in physiology and medicine; New York; Raven Press, 1976.
- [69] Reese TS, Karnovsky MJ: Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase; J Cell Biol 34:207-217, 1967.
- [70] Revest PA, Jones HC, Abbott NJ: Transendothelial electrical potential across pial vessels in anaesthetised rats: a study of ion permeability and transport of the blood-brain barrier; Brain Res 652:76-82, 1994.
- [71] Risau W, Wolburg H: Development of the blood-brain barrier; Trends Neurosci 13:174-178, 1990.
- [72] Risau W, Dingler A, Albrecht U, Dehouek MP, Cecchelli R: Blood-brain barrier pericytes are the main source of γ-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries; J Neurochem 58:667-672, 1992.
- [73] Roettger VR, Goldfinger MD: Evidence for amino acid concentration gradients between CSF and extracellular fluid; Neurosci Lett 178:197-200, 1994.
- [74] Ruetz S, Gros P: A Mechanism for P-glycoprotein action in multidrug resistance: are we there yet; Trends Pharmacol Sci 15,260-263, 1994.

- [75] Russel MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C: Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentration in smokers; Br Med J 280:972-976, 1980.
- [76] Sachs L: Angewandte Statistik: statistische Methoden und ihre Anwendung, 5. Auflage; Berlin, Heidelberg, New York; Springer, 1978.
- [77] Schilling L, Ksoll E, Wahl M: Effects of histamine on vasomotor response and permeability of extraparenchymal cerebral vessels; J Cereb Blood Flow Metab 7, Suppl. 1:S506, 1987.
- [78] Schilling L, Bultmann A, Wahl M: Lack of effect of topically applied nicotine on pial arteriole diameter and blood-brain barrier integrity in the cat; Clin Investig 70:210-217, 1992.
- [79] Schilling L, Wahl M: Histaminergic effects on cerebral hemodynamics; In: Phillis JW (ed): The regulation of cerebral blood flow; Boca Raton; CRC Press pp 113-128, 1993.
- [80] Schilling L, Wahl M: Effects of antihistaminics on experimental brain edema; Acta Neurochir Suppl 60:79-82, 1994.
- [81] Schilling L, Wahl M: Opening of the blood-brain barrier during cortical superfusion with histamine; Brain Res 653:289-296, 1994.
- [82] Schneider W, Wahl M, Kuschinsky W, Thurau K: The use of microelectrodes for measurement of local H⁺ activity in the cortical subarachnoidal space of cats; Pflügers Arch 372:103-107, 1977.
- [83] Smith TG Jr, Marks WB, Lange GD, Sheriff WHJr, Neale EA: Edge detection in images using marr-hildreth filtering techniques; J Neurosci Meth 26:75-82, 1988.
- [84] Sokoloff L: Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system; J Neurochem 29:13-26, 1977.
- [85] Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, Des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O, Shinohara M: The [¹⁴C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glukose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat; J Neurochem 28:897-916, 1977.

- [86] Sokoloff L: Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose; J Cereb Blood Flow Metab 1:7-36, 1981.
- [87] Tang J-P, Xu Z-Q, Douglas FL, Rakhit A, Melethil S: Increased Blood-Brain Barrier Permeability of Amino Acids in Chronic Hypertension; Life Sci 53:417-420, 1993.
- [88] Unterberg A, Baethmann AJ: The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema - part 1: cerebral exposure to bradykinin and plasma; J Neurosurg 61:87-96, 1984.
- [89] Unterberg A, Wahl M, Baethmann A: Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo; J Cereb Blood Flow Metab 4:574-585, 1984.
- [90] Unterberg A, Dautermann C, Baethmann A, Müller-Esterl W: The kallikreinkinin system as mediator in vasogenic brain edema - part 3: inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain; J Neurosurg 64:269-276, 1986.
- [91] Unterberg A, Wahl M, Hammersen F, Baethmann A: Permeability and vasomotor response of cerebral vessels during exposure to arachidonic acid; Acta Neuropathol 73:209-219, 1987.
- [92] Unterberg A, Wahl M, Baethmann A: Effects of free radicals on permeability and vasomotor response of cerebral vessels; Acta Neuropathol 76:238-244, 1988.
- [93] Unterberg A, Wahl M: Regulation of cerebral blood flow: a brief review; In: Schmiedek P, Einhäupl K, Kirsch C-M (eds): Stimulated cerebral blood flow; Berlin; Springer pp 3-11, 1992.
- [94] Vigne P, Farre AL, Frelin Ch: Na+-K+-Cl- Cotransporter of Brain Capillary Endothelial Cells; J Biol Chem 269:19925-19930, 1994.
- [95] Villringer A, Dirnagl U, Them A Schürer L, Krombach F, Einhäupl KM: Imaging of leukocytes within the rat brain cortex in vivo; Microvasc Res 42:305-315, 1991.
- [96] Wahl F: Digitale Bildverarbeitung, Nachrichtentechnik Band 13; Berlin; Springer, 1984.
- [97] Wahl M, Kuschinsky W: The dilatatory action of adenosine on pial arteries of cats and its inhibition by theophylline; Pflügers Arch 362:55-59, 1976.

- [98] Wahl M, Kuschinsky W: Influence of H⁺ and K⁺ on adenosine-induced dilatation at pial arteries of cats; Blood Vessels 14:284-293, 1977.
- [99] Wahl M, Kuschinsky W: Autonomic receptors as studied in pial vessels microapplication in situ; In: Owman Ch, Edvinsson L (eds): Neurogenic control in the brain circulation; Oxford; Pergamon Press pp 185-196, 1977.
- [100] Wahl M, Kuschinsky W: The dilating effect of histamine on pial arteries of cats and its mediation by H₂ receptors; Circ Res 44:161-165, 1979.
- [101] Wahl M, Kuschinsky W: The role of local chemical factors in the adjustment of cerebrovascular resistance during functional hyperemia and autoregulation;
 In: Kovach AGB, Dora E, Kessler M, Silver JA (eds): Oxygen transport to tissue; Oxford; Pergamon Press pp 137-144, 1981.
- [102] Wahl M, Unterberg A, Baethmann A: Effects of bradykinin on permeability and diameter of cerebral vessels, In: Auer LM, Loew F (eds): The cerebral veins; Wien; Springer pp 119-122, 1983.
- [103] Wahl M: Local chemical, neural, and humoral regulation of cerebrovascular resistance vessels; J Cardiovasc Pharmacol 7:S36-S46, 1985.
- [104] Wahl M, Unterberg A, Baethmann A: Intravital fluorescence microscopy for the study of blood-brain barrier function; Int J Microcirc Clin Exp 4:3-18, 1985.
- [105] Wahl M, Unterberg A, Baethmann A, Schilling L: Mediators of blood-brain barrier dysfunction and formation of vasogenic brain edema; J Cereb Blood Flow Metab 8:621-634, 1988.
- [106] Wahl M, Schilling L: Effects of bradykinin in the cerebral microcirculation; In: Phillis JW (ed): The regulation of blood flow; Boca Raton; CRC Press pp 315-328, 1993.
- [107] Wahl M, Schilling L: Mediators inducing stasis in cerebral microvessels during ischemia; In: Tomita M et al. (eds): Microcirculatory stasis in the brain; Amsterdam; Elsevier Science Publ; pp 305-310, 1993.
- [108] Wahl M, Schilling L, Unterberg A, Baethmann A: Mediators of vascular and parenchymal mechanisms in secondary brain damage; Acta Neurochir 57:64-72, 1993.

- [109] Wahl M, Schilling L, Unterberg A, Baethmann A: Opening of the blood-brain barrier by autacoids; In: Felgenhauer K, Holzgraefe M, Prange HW (eds): CNS barriers and modern CSF diagnostics - centennial of Quincke's lumbar puncture; Weinheim; Verlag Chemie pp 145-152, 1993.
- [110] Witte S: Scanning microfluorometry in intravital microvascular research; Res Exp Med 189:229-239, 1989.

Anhang

Digitale Filterfunktionen

Im Verlauf der Dissertation wurde des Öfteren von Filterungen (Medianfilterung bzw. Tiefpaßfilterung) eines Bildes gesprochen. Dazu stellt sich die Frage, wie ein digital abgespeichertes Bild gefiltert wird (siehe auch Gonzales und Wintz [40] und Wahl [96]). Smith et al. [83] beschreiben z. B. die Kantendetektion mit Hilfe eines Marr-Hildreth-Filters. Zum Filtern benötigt man einen sogenannten Filterkernel. Dieser ist quadratisch und hat eine ungerade Seitenlänge n, die größer oder gleich drei sein muß (n=3,5,7,9,...). Man spricht dann von einem n*n-Kernel. Jeder Kernel besitzt dann die Spalten 0,1,...,n-1 und die Zeilen 0,1,...,n-1 und hat einen zentralen Punkt bei der Spalte (n-1)/2 und der Zeile (n-1)/2. Dieser Kernel wird dann über jeden Pixel des zu digitalisierenden Bildes gelegt. Dabei überlappen sich n² Pixel des Bildes mit dem n² großen Filterkernel. Aus dem sich überlappenden Bereich wird ein neuer Grauwert ermittelt (siehe folgende Kapitel) und an die Stelle im gefilterten Bild gesetzt, die der zentrale Punkt des Kernels momentan bedeckt. Da der Kernel nicht über das Bild hinausgehen darf, verkleinert sich das gefilterte Bild im Allgemeinen um n-1 Zeilen und n-1 Spalten. Für jeden Pixel müssen bei einer Filterung eine Reihe von Rechenoperationen ausgeführt werden. Dazu zählen vor allem auch die Lesevorgänge aus dem Bildspeicher. Die Anzahl der Operationen, und damit die Rechenzeit, steigt quadratisch mit n. Somit sind bei einer Berücksichtigung der Rechenzeit kleinere Werte für **n** (z.B. **n**=3) vorzuziehen und meist auch ausreichend.

A1. Medianfilterung

Bei einer Medianfilterung werden die n^2 Werte des Bildes, die von dem n^*n -Kernel bedeckt werden, der Größe nach sortiert und der Medianwert dieser Liste wird als ermittelter Wert in das gefilterte Bild eingesetzt. Der Medianwert ist der Wert, der in der Mitte der sortierten Liste, also an Position (n^2+1)/2 steht.

Um den Rand des Bildes nicht zu verlieren, kann man den Kernel auch über den Rand der Bilder legen. Bei der Medianwertbestimmung wird dann nur eine Liste aus den Werten erstellt, die im gültigen Bildbereich vom Kernel bedeckt werden. Dabei kann es sein, daß die Liste eine gerade Anzahl **m** von Elementen enthält. Der Medianwert ermittelt sich dann aus dem gerundeten Mittelwert der mittleren beiden Elemente der sortierten Liste, also aus dem gerundeten Mittelwert der Elemente **m**/2 und **(m**/2)+1.

Da bei der Medianfilterung ein Sortieralgorithmus pro zu ermittelnden Wert eingesetzt werden muß, ist diese Filterung sehr zeitaufwendig. Daher sollte sich die Medianfilterung auf einen 3*3-Kernel beschränken. Die Ermittlung der Medianwerte erfolgt Zeile für Zeile. Abgesehen von der ersten Berechnung je Spalte, werden zur Beschleunigung des Algorithmus anstatt aller **n*n** Werte nur **n** Werte der neuen Spalte gelesen, da die restlichen (**n-1)*n** Werte von der vorhergehenden Berechnung noch vorhanden sind.

Eine Medianfilterung eignet sich zur Minderung des Rauschens in einem Bild wie unter Kapitel 9.2. gezeigt. Kanten und Sprünge im Bild (z.B. verursacht durch Gefäße) bleiben auch nach der Filterung in vollem Umfang erhalten.

A2. Tiefpaßfilterung

Bei einer Tiefpaßfilterung (wie auch bei einer Hochpaßfilterung) ist der Kernel mit Werten belegt, die jeweils mit dem entsprechenden abgedeckten Pixel des Bildes multipliziert werden. Anschließend werden alle **n**² Produkte addiert. Diese Summe ist der Wert des gefilterten Bildes an der Stelle, die vom zentralen Punkt des Kernels momentan bedeckt wird. Von der Belegung des Kernels hängt es ab, um welche Art der Filterung (Hochpaß- oder Tiefpaßfilter) es sich handelt. Da eine Hochpaßfilterung in dieser Art nicht verwendet wird, beschränke ich mich hier auf die Beschreibung einer Tiefpaßfilterung.

Die Belegung des Kernels bei einer Tiefpaßfilterung ist gleichmäßig, d.h. alle n^2 Positionen des Kernels enthalten den selben Wert. Da das Ergebnis der Filterung wieder einen gültigen Grauwert ergeben muß, muß die Summe der Kernelelemente 'eins' ergeben. Daraus folgt, daß jede Position des n^*n -Kernels bei einer Tiefpaßfilterung mit dem Wert $1/n^2$ belegt werden muß. Diese Tiefpaßfilterung entspricht einer Mittelung über den vom Kernel abgedeckten Bereich. Der resultierende Grauwert des gefilterten Bildes ist demnach der gerundete Mittelwert.

Somit kann auch der Rand einfach berücksichtigt werden, indem man den Bereich mittelt, der im gültigen und vom Kernel bedeckten Bildbereich liegt. Dabei müssen nur die gültigen Bildpunkte addiert und durch deren Anzahl dividiert werden.

Auch hier kann man eine Beschleunigung des Algorithmus bewirken, wie es im vorhergehenden Kapitel beschrieben wurde.

Eine Tiefpaßfilterung glättet plötzliche Sprünge und Kanten im Bild und 'verschmiert' diese zu kontinuierlichen Rampen. Hochfrequente Anteile (Kanten und plötzliche Sprünge) werden gelöscht, aber niederfrequente Anteile (homogene Bildbereiche) bleiben erhalten. Folgendes Beispiel zeigt eine Tiefpaßfilterung eines 11*11 Pixel großen Bildes mit einem 5*5-Kernel. Das zu filternde Bild ist wie folgt mit den Grauwerten 0 bzw. 250 besetzt:

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	250	250	250	250	250	250
0	0	0	0	0	250	250	250	250	250	250
0	0	0	0	0	250	250	250	250	250	250
0	0	0	0	0	250	250	250	250	250	250
0	0	0	0	0	250	250	250	250	250	250
0	0	0	0	0	250	250	250	250	250	250

Nach einer Tiefpaßfilterung mit einem 5*5-Kernel erhält man folgendes gefiltertes Bild. Die eingeklammerten Grauwerte geben die Werte für den Randbereich an, wenn dieser nach dem oben beschriebenen Verfahren berücksichtigt wird.

(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
(0)	(0)	0	0	0	0	0	0	0	(0)	(0)
(0)	(0)	0	10	20	30	40	50	50	(50)	(50)
(0)	(0)	0	20	40	60	80	100	100	(100)	(100)
(0)	(0)	0	30	60	90	120	150	150	(150)	(150)
(0)	(0)	0	40	80	120	160	200	200	(200)	(200)
(0)	(0)	0	50	100	150	200	250	250	(250)	(250)
(0)	(0)	0	50	100	150	200	250	250	(250)	(250)
(0)	(0)	(0)	(50)	(100)	(150)	(200)	(250)	(250)	(250)	(250)
(0)	(0)	(0)	(50)	(100)	(150)	(200)	(250)	(250)	(250)	(250)

Man sieht, daß sich die Werte im Randbereich gut einfügen. Der im Originalbild liegende Sprung von 0 auf 250 wird zu einer Rampe 'verschmiert'.

Mein persönlicher Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Univ. Prof. Dr. M. Wahl sowie Herrn Priv. Doz. Dr. L. Schilling für die Betreuung und Unterstützung in meiner wissenschaftlichen Arbeit.

> Ferner möchte ich meinen Eltern für die persönliche und nicht zuletzt für die finanzielle Unterstützung großen Dank aussprechen.