

Ludwig-Maximilians-Universität
München
Physiologisches Institut

Prof. Dr. med. M. Wahl

Dipl.-Ing. Axel Findling:

Messung der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke
in vivo mittels computergestützter Bildauswertung

Gliederung

1. Einleitung

1.1 Begriffe

1.2 Versuchsvorbereitung

1.3 Versuchsdurchführung

1.4 Bildgewinnung

2. Software

2.1 Shadingkorrektur

2.1.1 Spezielle Tiefpaßfilterung

2.1.2 Gütevergleich

2.2 Helligkeitsangleich

2.3 Lagekorrektur

2.4 Subtraktion

2.5 Subtraktionsbildnachbearbeitung

2.5.1 Strukturelimination

2.6 Ef-Wert-Berechnung

3. Gütevergleich

3.1 Ermittlung der Fehlgüte

3.2 Ergebnis des Gütevergleichs

Einleitung

- Die Blut-Hirn-Schranke soll mittels Videoaufzeichnungen und Bildverarbeitungssoftware untersucht werden.
- Die Untersuchungen werden an Katzen in vivo durchgeführt.
- Die Auswertung erfolgt offline mit Hilfe eines Computers.
- Von meinem Vorgänger gab es bereits ein Verfahren, das in einigen Verarbeitungsschritten jedoch sehr grob gearbeitet hat.

Begriffe

- Die Blut-Hirn-Schranke ist eine Grenzschicht zwischen Blut und Gehirn. Sie ist eine Schutzfunktion des Gehirns, damit keine unerwünschten Stoffe an das Gehirn kommen.
- Ein Defekt der Blut-Hirn-Schranke stellt eine lebensbedrohliche Gefährdung des Patienten dar.
- Ein Defekt ist an sogenannten Extravasationen zu erkennen, die in den Testbildern als helle, punktförmige Bereiche zu erkennen sind, aber auch großflächig und diffus sein können.
- Die Aufzeichnungen erfolgen mit Hilfe intravitaler Fluoreszenzmikroskopie, bei der mit einer Quecksilberlampe ein fluoreszierender Stoff mit einer Wellenlänge von 495nm angeregt wird und der dann Licht mit einer Wellenlänge von 525nm abgibt. Dieses Licht kann dann aufgenommen werden.

Versuchsvorbereitung

(siehe Graphik 1)

- Das Versuchstier (Katze) wird narkotisiert und relaxiert.
- Wegen der Relaxation muß das Versuchstier künstlich beatmet werden.
- Der Schädelknochen wird geöffnet und die Dura (harte Hirnhaut) wird entfernt.
- Ein Wall aus Dentalzement wird um den freigelegten Hirnbereich errichtet.
- Der Raum über der Hirnoberfläche wird zum Schutz vor Austrocknung mit Paraffinöl gefüllt.
- Ein fluoreszenzhaltiger Tracer wird in den Blutkreislauf injiziert. (Fluorescein, FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-Dextran)
- Da der Tracer wasserlöslich ist, kann er nicht aus den Blutgefäßen diffundieren, es sei denn die Blut-Hirn-Schranke ist defekt.

Versuchsdurchführung

- 4 Beobachtungsfelder auf der Hirnoberfläche werden definiert. (Größe: 6,125mm*4,05mm)
- Die Positionen des computergesteuerten x,y-Tisches werden programmiert.
- Je ein Referenzbild unter Paraffinöl wird aufgenommen.
- Der zu untersuchende Stoff (z.B. Nicotin, Histamin, Adenosin; eine Testsubstanz pro Versuchstier) wird superfundiert und die Testbilder werden aufgenommen.
- Die Konzentration der Testsubstanz wird um das Zehnfache gesteigert und weitere Testbilder werden aufgenommen.
- Superfusion bedeutet direktes Auftragen auf die Hirnoberfläche, so daß die Testsubstanz das Gehirn direkt beeinflussen kann (in das Gehirn superfundiert).

Bildgewinnung

(siehe Graphik 2)

- Das Beatmungsgerät triggert den Shutter, so daß beim inspiratorischem Plateau der Lichtweg zum Videorekorder freigegeben wird.
(Dauer ca. 1sec, dabei fast keine Druckänderungen im Gehirn)
- Die Bilder, die als Film auf einem U-matic SP-Videoband gespeichert sind, werden über die Bildkarte in folgendes Bildformat digitalisiert:
512 Zeilen * 503 Spalten / 256 Graustufen (8 Bit)
- Zur Rauschminderung werden 10 aufeinanderfolgende Einzelbilder aus einer Videosequenz digitalisiert und arithmetisch gemittelt. (Ergebnis siehe Bildbeispiele 1 und 2)
- Die gemittelten Bilder werden zur Archivierung auf der Festplatte des Computers gespeichert. (Speicherbedarf pro Bild ca. 1/4 MByte; ca. 70 Bilder pro Versuch)
- Je Beobachtungsfeld erhält man ein Referenzbild (das zeitlich erste) und mehrere Testbilder.

Software

- Ziel ist es ein Programm zu entwickeln, das den Extravasationsgrad (Stärke des Traceraustritts) eines Bildes in Form einer reellen Zahl (Ef-Wert) ermittelt.
- Die Software wurde mit Borland Turbo C++ geschrieben.
- Graphik 3 zeigt das Programmablaufscha.ema.
- Es wird das optimierte Verfahren beschrieben, das anhand des in Kapitel 3. beschriebenen Gütevergleichs ermittelt wurde.

Shadingkorrektur

- Zweck: Die ungleiche Helligkeitsverteilung innerhalb eines Bildes muß korrigiert werden, um bei der Subtraktion niveaugleiche Regionen zu erhalten.
- Ursache: ungleichmäßiges Anregungslicht (siehe Bildbeispiel 3)
- Prinzipiell sind verschiedene Verfahren möglich. Daher ist ein Gütevergleich notwendig.
- Das alte Verfahren arbeitet mit einem speziell aufgenommenen Shadingkorrekturbild. (siehe Bildbeispiel 3)
- Das neues Verfahren (spezielle Tiefpaßfilterung) ermittelt ein Shadingkorrekturbild aus dem zu korrigierendem Bild selbst. (siehe Bildbeispiel 4)
- Das Ergebnis der Korrektur sieht man in den Bildbeispielen 5 und 6 (im Vergleich zu 1 bzw. 2).

Spezielle Tiefpaßfilterung

- Unterteilen des Bildes in 21×21 Regionen (jede Region besteht aus 25×25 Pixel)
- Bestimmung der mittleren Grauwerte jeder Region
- Neues Bild der Größe 21×21 mit den mittleren Grauwerten als Bildpunkte
- Zerlegen des Bildes in binäre Graustufenebenen
- Erosion - Dilatation, Dilatation - Erosion jeder der Graustufenebenen (Erosion siehe Graphik 4; Dilatation siehe Graphik 5)
- Zusammensetzen der Graustufenebenen zu einem Bild (Größe 21×21 Pixel)
- Tiefpaßfilter mit Kernel 3×3 (Glättung)
- Zoomen des Bildes auf die Originalgröße (512×503 Pixel)
- Tiefpaßfilter mit Kernel 25×25

Gütevergleich

- Das Bild wird in 6*6 Regionen unterteilt.
- Die mittleren Intensitäten je Region werden gemessen.
- Der Mittelwert, die absolute und die relative Standardabweichung (ideal: 0) werden bestimmt. (siehe Graphik 6)
- Der Referenzwert für die Bilder ist der Wert der relativen Standardabweichung für das zugehörige unkorrigierte Bild.
- Die Korrekturgüte wird aus der Summe der Differenzen (Referenzwert - Wert) bezogen auf die Summe der Referenzwerte über alle untersuchten Bilder bestimmt.
- Graphik 7 zeigt die Güte der Korrektur im Vergleich.

Helligkeitsangleich

- Zweck: Ungleiche Helligkeitsniveaus der Bilder müssen ausgeglichen werden. (Zu dunkle Bilder werden im Helligkeitsniveau angehoben.)
- Ursachen: Spontane Schwankungen in der Helligkeit der Lampe; Ungenauigkeiten in der Fokussierung
- Das Referenzbild und das Testbild werden in je 5*5 Felder unterteilt, und deren mittlere Intensitäten werden gemessen.
- Aus der Intensität des dunkelsten Feldes des Testbildes und dem lageentsprechendem Wert des Referenzbildes wird ein Faktor h ermittelt, mit dem das Testbild multipliziert wird.
- Faktor $h = I(\text{Ref})/I(\text{Test})$;
falls $h < 0,993$ ist, dann gilt: $h = 0,993$;
 $I'(\text{Test}) = I(\text{Test}) * h$;

Lagekorrektur

- Lageverschiebungen werden verursacht z.B. durch atemgekoppelte Bewegungen der Hirnoberfläche und Gefäßbewegungen.
- Wegen der Bildsubtraktion ist eine Lagekorrektur notwendig.
- Das Referenzbild und ein Testbild werden eingelesen und das Referenzbild wird vom Testbild subtrahiert.
- Das Testbild wird um ganze Pixel in x- und y-Richtung (Spalten und Zeilen) verschoben, bis die Bilder sich möglichst exakt überlagern.
- Die x- und y-Verschiebungen gegenüber dem Referenzbild werden gespeichert.
- Mit den gespeicherten Werten werden im Programmablauf die Testbilder lagekorrigiert.
- Eine automatische Lagekorrektur zeigte schlechtere Ergebnisse.

Subtraktion

- Zweck: Bei der Subtraktion sollten nur noch die Unterschiede des Testbildes gegenüber dem Referenzbild übrigbleiben und die Gefäße aus dem Bild verschwinden.
- Von jedem Pixel des Testbildes wird der entsprechende Pixel des Referenzbildes subtrahiert.
- Zur Rauschminderung wird das Subtraktionsbild mit einem 3*3 Kernel medianefiltert.
(Ergebnis siehe Bildbeispiele 7 und 8)

Subtraktionsbildnachbearbeitung

- Zweck: Optimieren der Ergebnisse
- 3 Schritte der Nachbearbeitung:
 - Löschen aller Grauwerte, die kleiner als 4 sind
 - Strukturelimination -> 2.5.1
 - Flächenelimination
- Bei der Flächenelimination werden alle Flächen, die kleiner sind als 895 zusammenhängende Pixel aus dem Bild gelöscht. (Ergebnis siehe Bildbeispiele 9 und 10)

Strukturelimination

- Das Subtraktionsbild wird in horizontaler, vertikaler und in den zwei digonalen Richtungen nach zusammenhängenden Strecken ungleich Null abgetastet.
- Aus den gefundenen Streckenlängen wird für jede Richtung ein Histogramm gebildet.
- Der Median jeder Richtung wird bestimmt und alle Strecken, die kürzer oder gleich dem Median sind, werden aus dem Bild gelöscht.

Ef-Wert-Berechnung

- Der mittlere Grauwert über das ganze Bild (ohne die Ränder, die bei der Lagekorrektur entstehen) ergibt den Extravasationswert (Ef-Wert).

Gütevergleich

- Verschiedene Verfahren müssen gleichwertig verglichen werden können, damit das beste Verfahren ermittelt werden kann.
- Günstig ist ein Wert je Verfahren, der darüber Auskunft gibt.
- Zum Vergleich braucht man Referenzwerte, die den tatsächlichen Zustand je Bild wiedergeben.
- Mit dem Gütevergleich besteht die Möglichkeit Parameter zu optimieren und verschiedene Programme zu vergleichen.

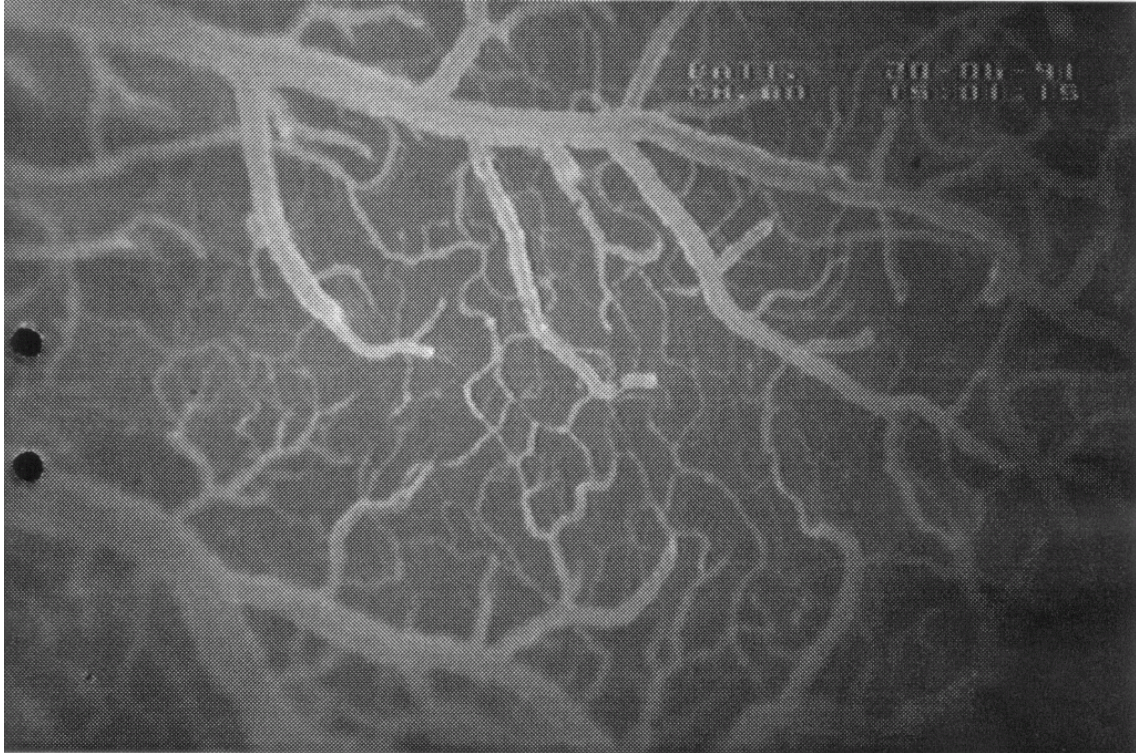
Ermittlung der Fehlgüte

- Auswahl von vier Versuchstagen (263 Bilder) und Kategorisierung jedes Bildes in eine von vier Gruppen (Soll-Wert):
 - 0: keine Extravasation
 - 1: ein Extravasationsspot
 - 2: mehrere Extravasationsspot
 - 3: konfluierende Spots oder großflächige Extravasation
- Festlegen entsprechender vier Bereiche bei den berechneten Ergebnissen (Ist-Wert)
- Absolute Subtraktion je Bild von Soll- und Ist-Wert ==> Fehlgüte je Bild (Optimal: 0)
- Addition aller Fehlgüten über alle Bilder und Normierung ==> ein Fehlgütewert repräsentativ für das Verfahren

Ergebnis des Gütevergleichs

- Das Verfahren zeigt die gleiche Tendenz wie der Korrelationskoeffizient nach Spearman.
- Man erhält eine schrittweise Verbesserung der Sensitivität des gesamten Verfahrens durch die vorher beschriebenen Bearbeitungsschritte wie es in Graphik 8 dargestellt ist.
- Die Fehlgüte G ist in Graphik 8 normiert auf Werte zwischen 0% und 100%; je kleiner die Fehlgüte ist, desto sensibler ist das Verfahren.
- Zum Vergleich enthält die Graphik 8 auch den Wert des zuvor verwendeten Verfahrens.

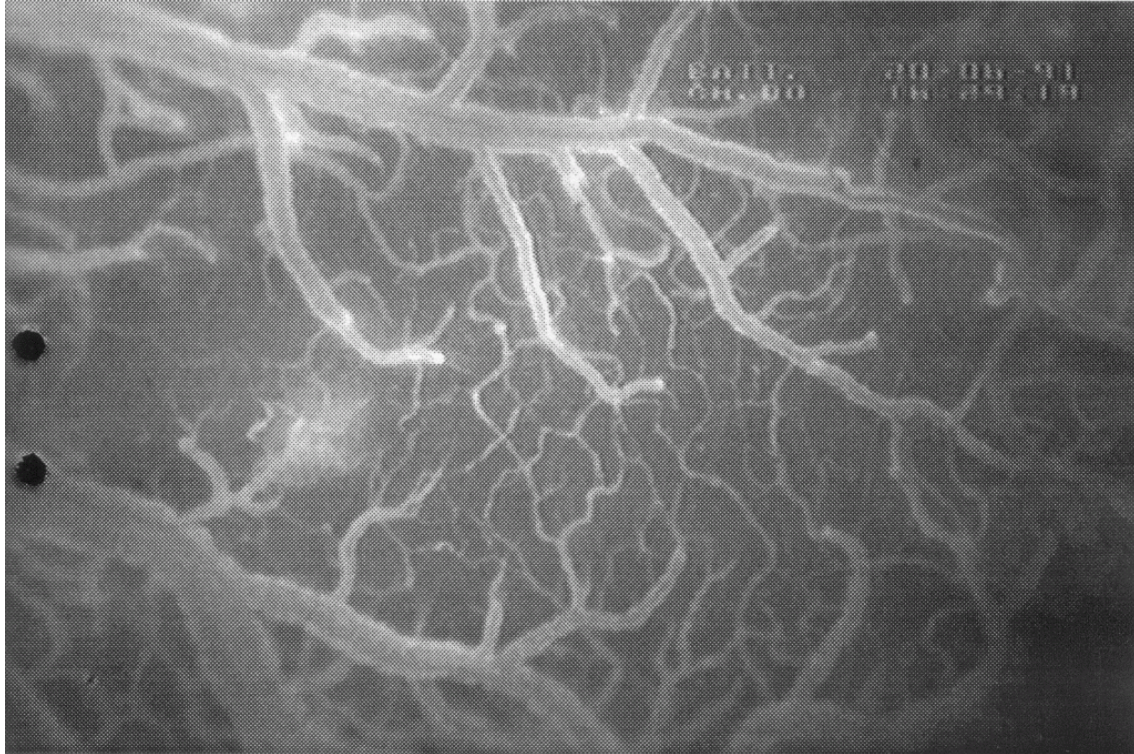
Bildbeispiel 1



Beobachtungsfeld ohne Extravasation

Digitalisiert und zehnfach gemittelt

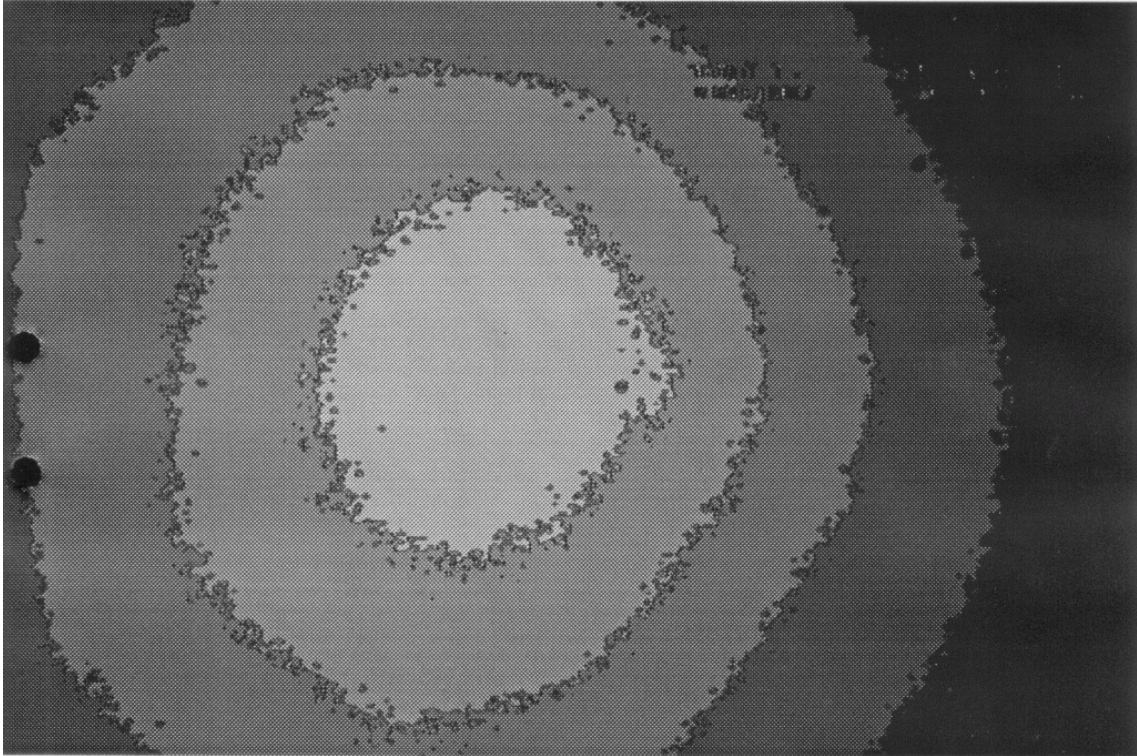
Bildbeispiel 2



Beobachtungsfeld mit Extravasation

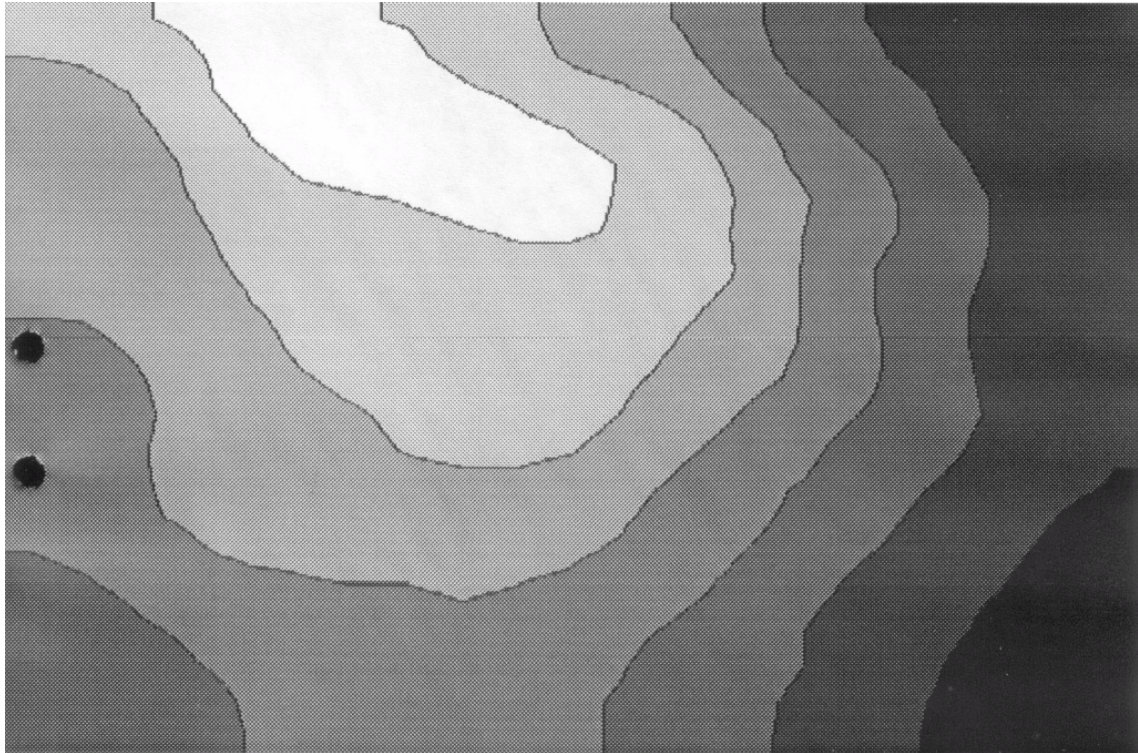
Digitalisiert und zehnfach gemittelt

Bildbeispiel 3



Aufnahme eines Gefäßes mit fluoreszierender
Flüssigkeit

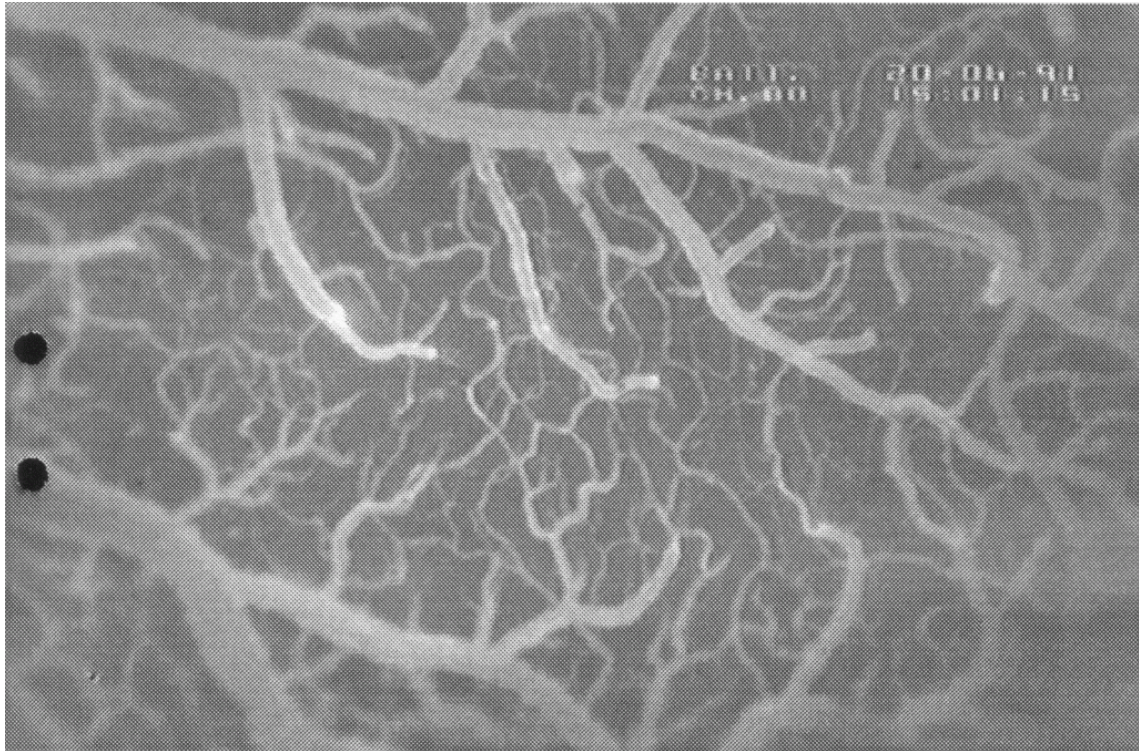
Bildbeispiel 4



Beobachtungsfeld ohne Extravasation

Shadingkorrekturbild

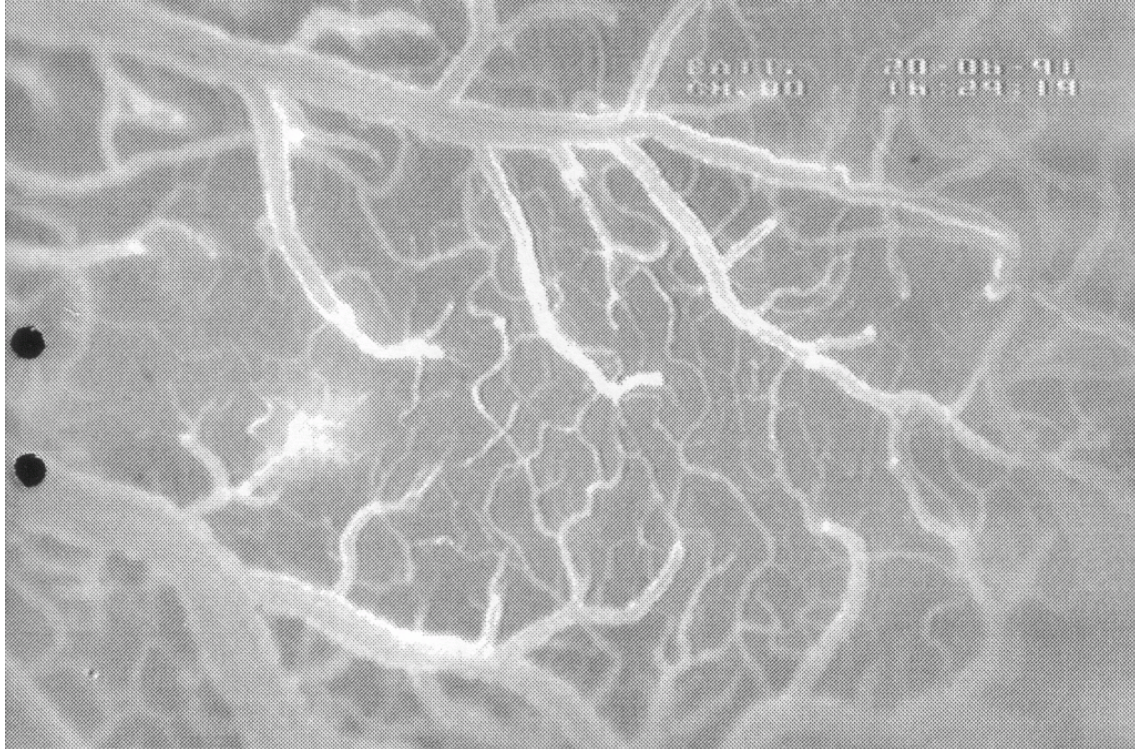
Bildbeispiel 5



Beobachtungsfeld ohne Extravasation

Shadingkorrigiert

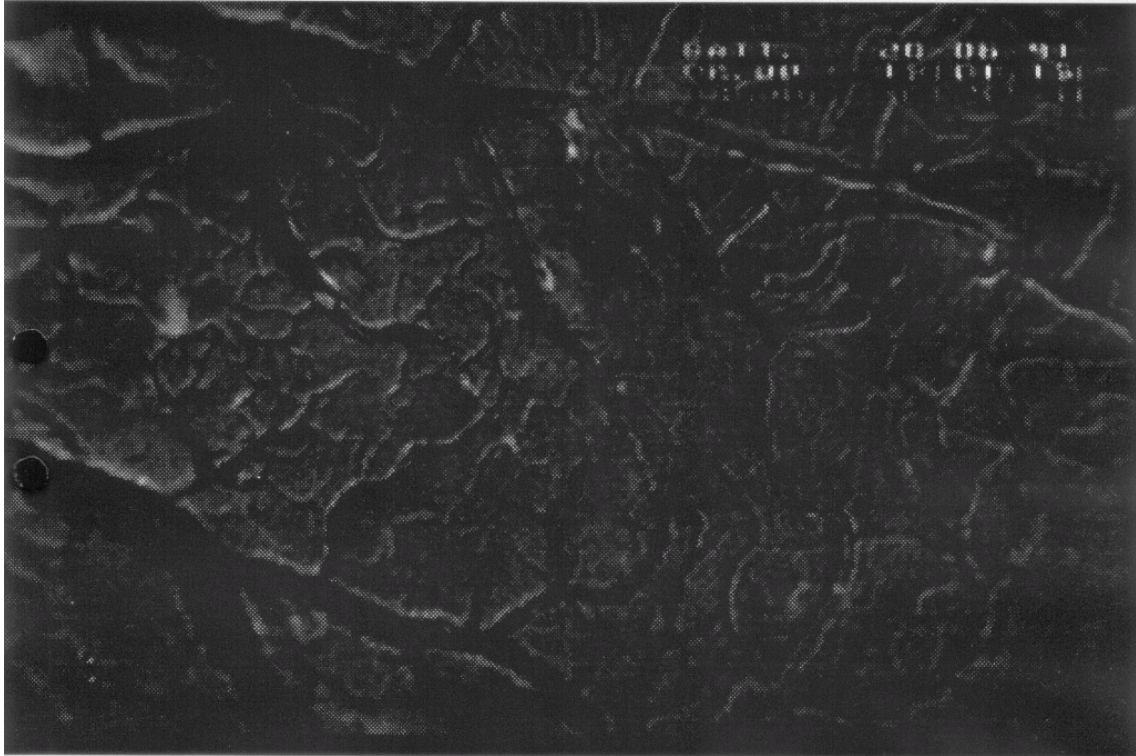
Bildbeispiel 6



Beobachtungsfeld mit Extravasation

Shadingkorrigiert

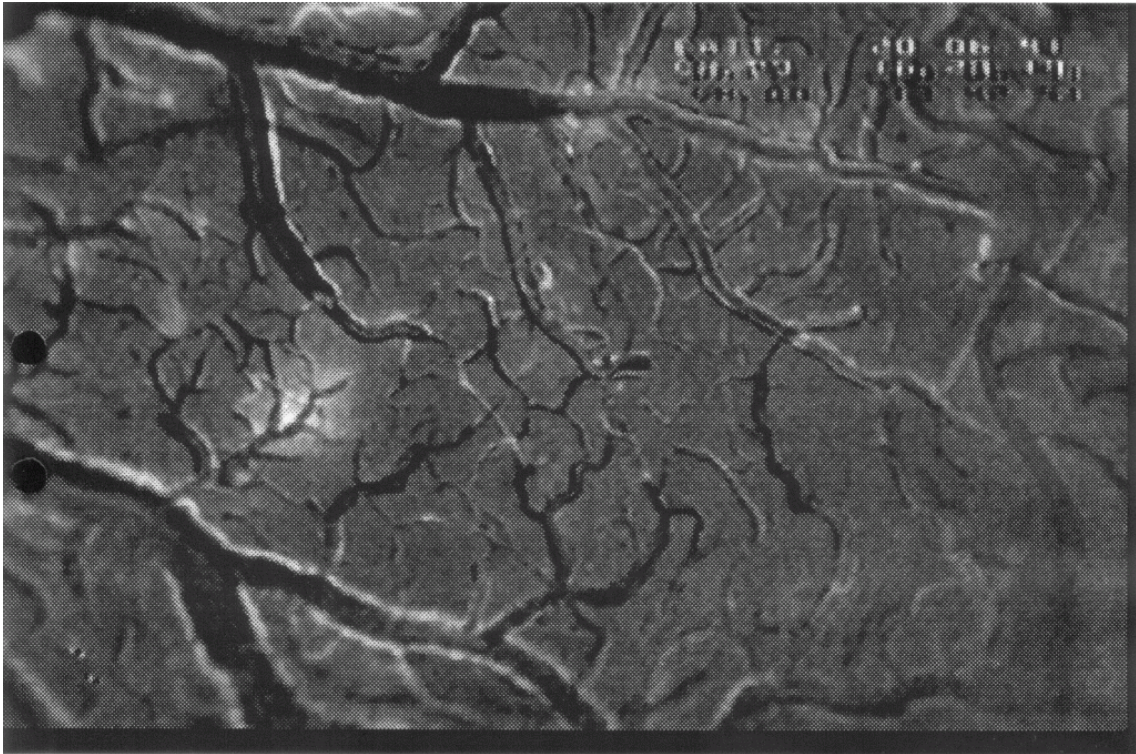
Bildbeispiel 7



Beobachtungsfeld ohne Extravasation

Subtraktionsbild

Bildbeispiel 8



Beobachtungsfeld mit Extravasation

Subtraktionsbild

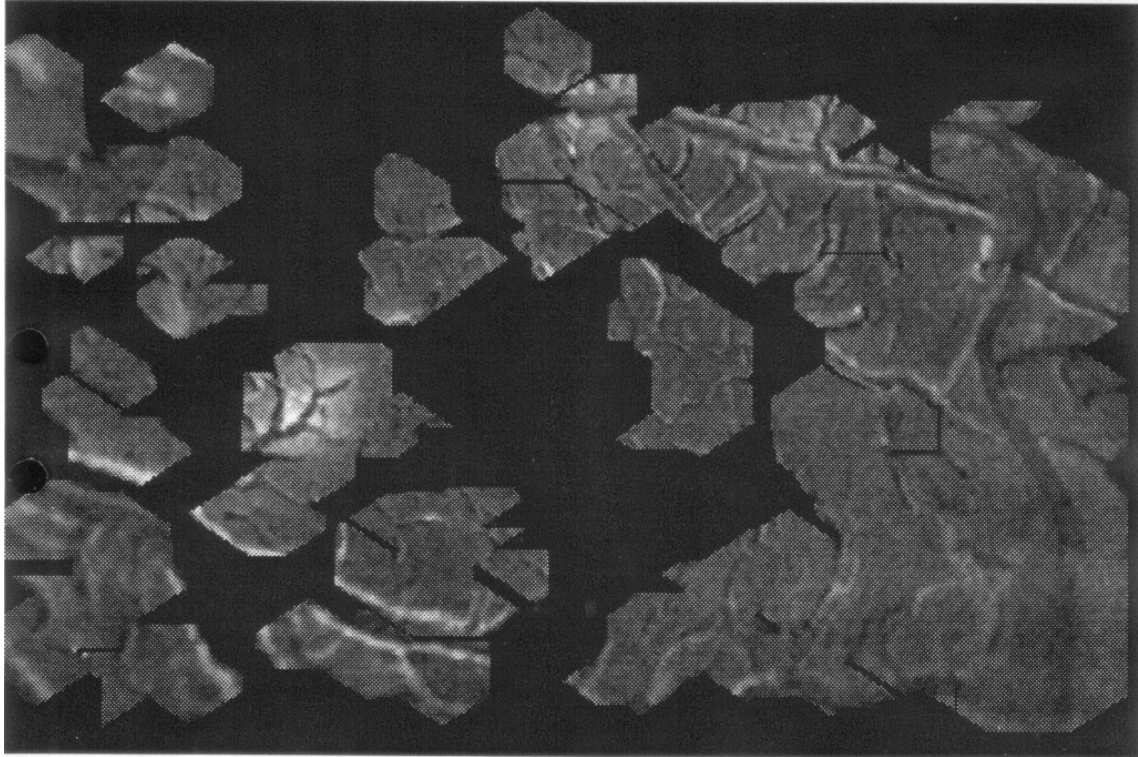
Bildbeispiel 9



Beobachtungsfeld ohne Extravasation

Subtraktionsbild bearbeitet

Bildbeispiel 10

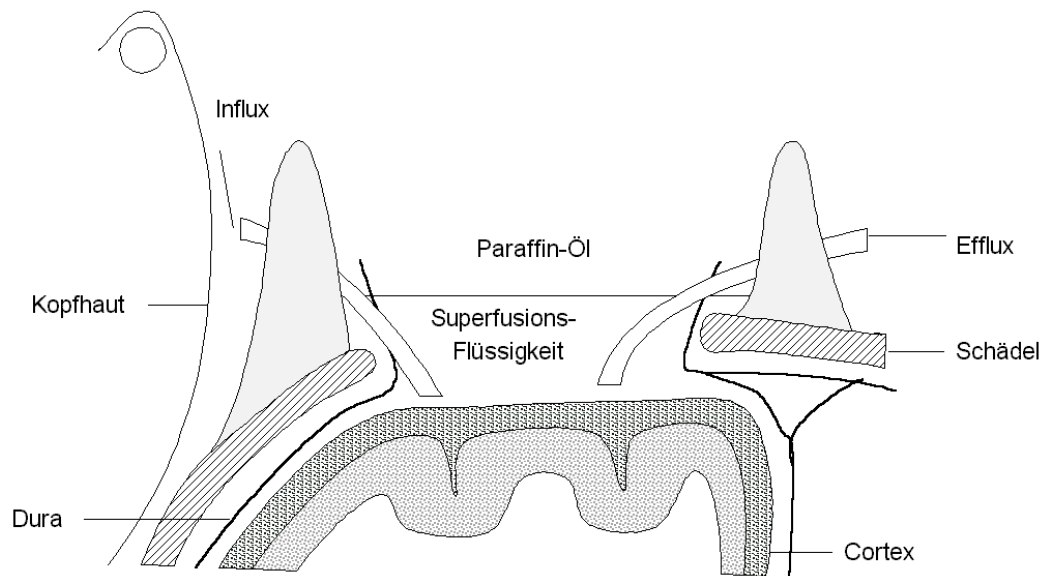


Beobachtungsfeld mit Extravasation

Subtraktionsbild bearbeitet

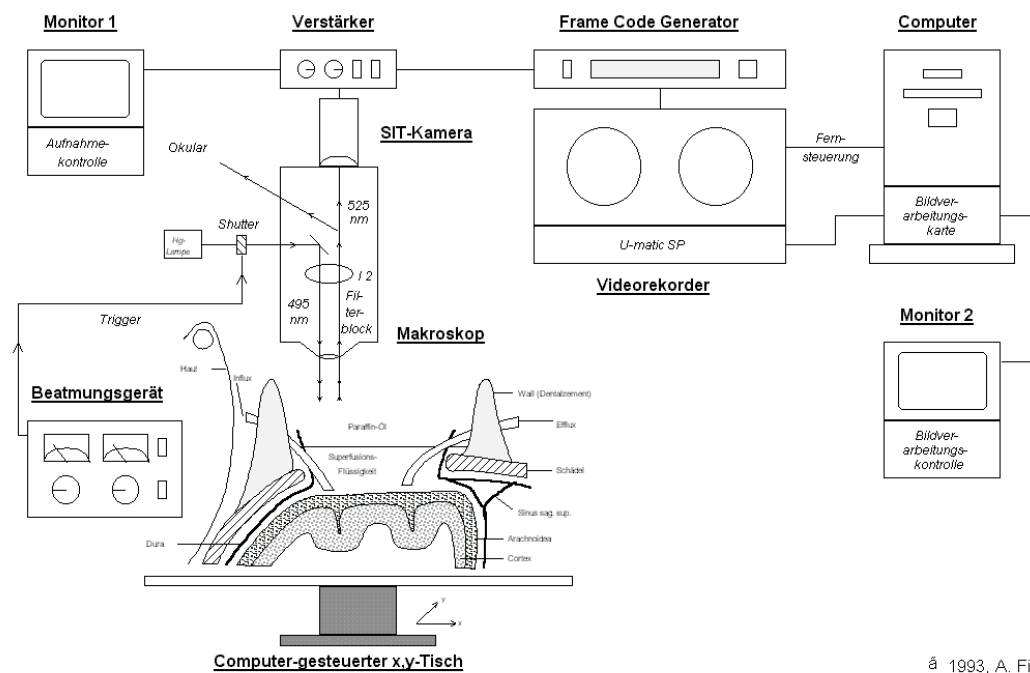
© 1993, A. Findling

Graphik 1



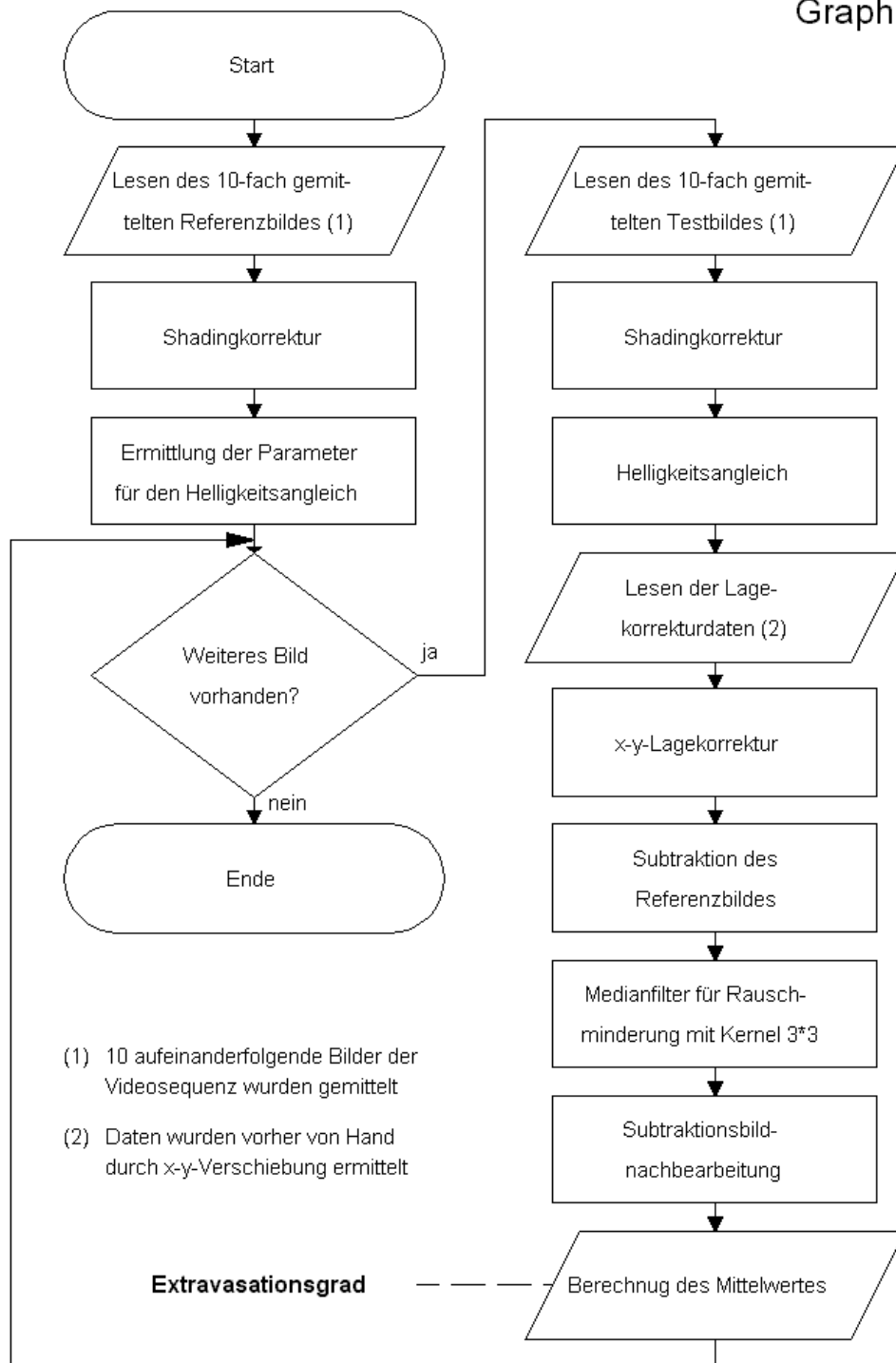
© 1993, A. Findling

Graphik 2



© 1993, A. Findling

Graphik 3



Erosion

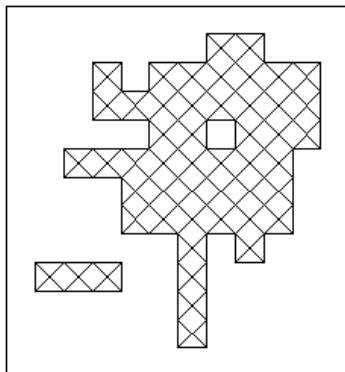
Bearbeitungskernel:



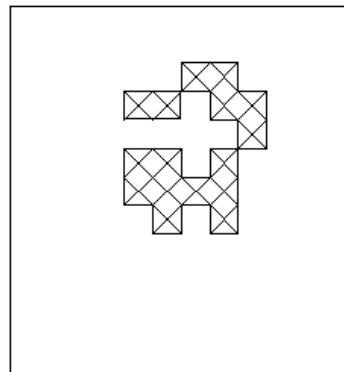
Vorschrift:

Hat ein gesetzte Pixel einen Nachbarn,
der nicht gesetzt ist, wird der Pixel gelöscht.

vorher:



nachher:



Dilatation

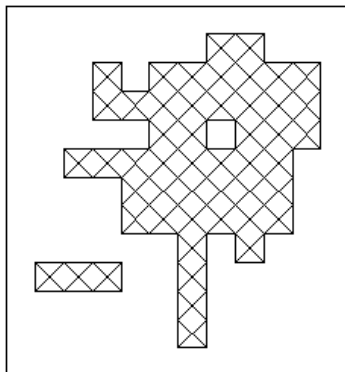
Bearbeitungskernel:



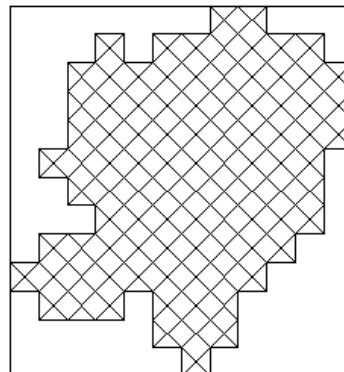
Vorschrift:

Hat ein gelöschter Pixel einen Nachbarn,
der gesetzt ist, wird der Pixel gesetzt.

vorher:

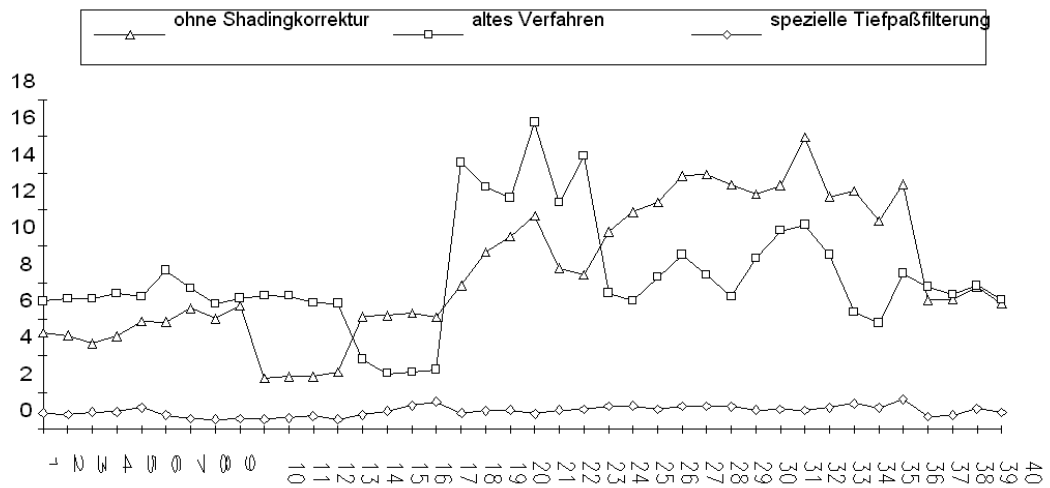


nachher:



Graphik 6

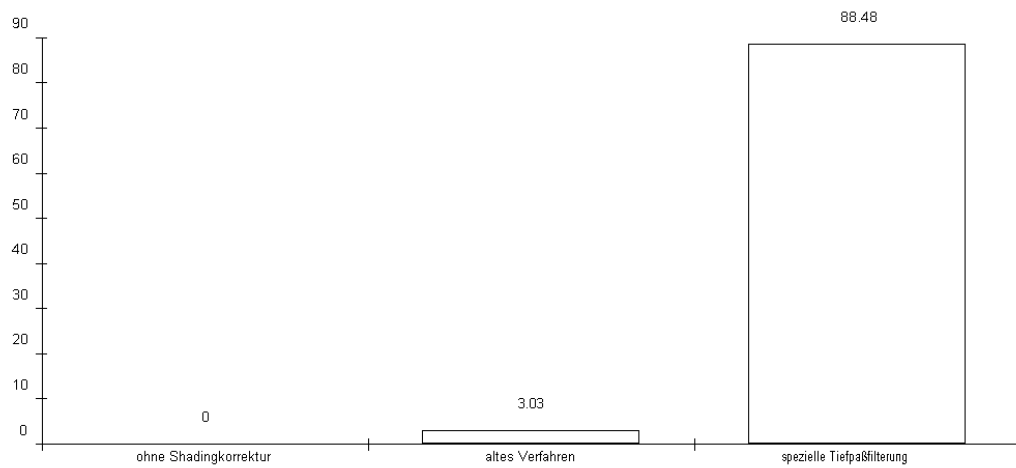
Relative Standardabweichung



© 1993, A. Findling

Graphik 7

Korrekturgüte



© 1993, A. Findling

Fehlgüte

